



**Universidade de Aveiro**  
**2005**

Departamento de Biologia

**David Miguel  
Mota Fernandes**

**Desenvolvimento de formulações lipossomais de  
fármacos Leishmanicidas**



**Universidade de Aveiro** Departamento de Biologia  
**2005**

**David Miguel  
Mota Fernandes**

## **Desenvolvimento de formulações lipossomais de fármacos Leishmanicidas**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica da Doutora Maria Eugénia Cruz. Investigadora principal responsável pela Unidade de Novas Formas de Agentes Bioactivos do Departamento de Biotecnologia do Instituto Nacional de Engenharia Tecnologia e Inovação, EP (INETI).

“Um viajante ia caminhando em solo distante, às margens de um grande lago de águas cristalinas. Seu destino era a outra margem. Suspirou profundamente enquanto tentava fixar o olhar no horizonte. A voz de um homem coberto de idade, um barqueiro, quebrou o silêncio momentâneo, oferecendo-se para transportá-lo. O pequeno barco envelhecido, no qual a travessia seria realizada, era provido de dois remos de madeira de carvalho. Logo os seus olhos perceberam o que pareciam ser letras em cada remo. Ao colocar os pés empoeirados dentro do barco, o viajante observou que se tratavam de duas palavras, num deles estava entalhada a palavra **ACREDITAR** e no outro, **AGIR**. Não podendo conter a curiosidade, o viajante perguntou a razão daqueles nomes originais dados aos remos. O barqueiro respondeu pegando no remo chamado **ACREDITAR** e remou com toda a força. O barco, então, começou a dar voltas sem sair do lugar em que estava. De seguida, pegou no remo **AGIR** e remou com todo o vigor. Novamente o barco girou em sentido oposto, sem seguir em frente. Finalmente, o velho barqueiro, segurando os dois remos, remou com eles em simultâneo e o barco, impulsionado por ambos os lados, navegou através das águas do lago chegando ao seu destino, a outra margem. Então o barqueiro disse ao viajante: Este porto chama-se autoconfiança. Simultaneamente é preciso **ACREDITAR** e **AGIR** para que possamos alcançá-la”

Daniela Marassia

Dedico esta tese aos meus pais que sempre se orgulharam do filho e que tudo fizeram para que este dia se pudesse proporcionar.

Com amor, para a minha namorada pelo seu incansável apoio.

## **o júri**

Presidente

Professor Doutor António José Arsénia Nogueira  
Professor Associado com Agregação da Universidade de Aveiro

Vogais

Professor Doutor João Nuno Sereno D´Almeida Moreira  
Professor Auxiliar da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (Arguente)

Doutora Maria Eugénia Meirinhos da Cruz  
Investigadora Principal com habilitação do INETI

## **agradecimentos**

À Doutora Eugénia Cruz por me ter aberto as portas do mundo da investigação, dando-me a oportunidade de subir a um patamar mais elevado no edifício científico. Agradeço o seu incentivo e toda a confiança depositada em mim. Agradeço também pelas críticas construtivas que foram necessárias para o meu aperfeiçoamento profissional. Estou imensamente grato pela a sua preocupação, ao longo do trabalho, no planeamento das experiências de forma a poder realizar esta dissertação no prazo definido e principalmente por ter contribuído para o crescimento do meu nível científico.

À Doutora Manuela Colla que além da orientação científica, me apoiou nesta caminhada. Obrigado pela convivência bastante agradável, pelas sugestões dadas e também por participarem da avaliação do meu trabalho.

À Doutora Manuela Gaspar pela gentileza e atenção em todos os momentos que solicitei o seu auxílio. Obrigado também pelo fornecimento de material bibliográfico que me ajudou na realização da presente dissertação e pela ajuda incansável em momentos difíceis em que o tempo era um factor a ter em conta.

À Doutora Luísa Corvo pelos ensinamentos, sugerindo alternativas no encaminhamento das experiências e especialmente pela ajuda imprescindível para a concretização dos estudos de estabilidade. Obrigado também pelo auxílio, disponibilidade, esclarecimento e resolução de problemas informáticos.

À Doutora Gabriela Santos Gomes pelo esclarecimento de dúvidas e revisão crítica desta dissertação. Agradeço também a disponibilidade, a gentileza e os ensinamentos dispensados.

À Filipa Pinhal pelos ensinamentos práticos, pelo auxílio em etapas determinantes na realização das experiências com animais e pelo agradável ambiente de trabalho.

À Doutora Sandra Simões, à Carla Eleutério, à Isabel Ataíde, à Cláudia Marques, à Filipa Penha e à Ana Sousa, pelos bons momentos, boa vontade, simpatia e boa disposição demonstrados ao longo destes meses.

## palavras-chave

leishmaniose visceral, ciclo de vida do parasita, tratamento, dinitroanilinas, formulações lipossomais de ORZ, modelo animal.

## resumo

A leishmaniose representa uma infecção endêmica que ocorre, predominantemente em países das regiões tropicais e subtropicais. Actualmente, a leishmaniose é considerada endêmica em 88 países e estima-se que 12 milhões de pessoas estejam infectadas. Mundialmente existem 2 milhões de novos casos por ano e 1/10 da população mundial está em risco de ser infectada. Além disso, a co-infecção com o vírus de imunodeficiência adquirida (HIV) é uma doença emergente em numerosas partes do mundo. A leishmaniose pode ser dividida, de acordo com as manifestações clínicas, em 3 grupos: cutânea, mucocutânea e visceral. A leishmaniose visceral é uma doença grave causada pelo crescimento de um protozoário do complexo *Leishmania donovani* ou *Leishmania infantum* em células do retículo endotelial. Um insecto (vector) é responsável pela transmissão do parasita entre pessoas ou animais. Estes parasitas desenvolvem uma variedade de mecanismos adaptativos que permitem a sua sobrevivência não só no vector, mas também na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado, conseguindo multiplicar-se em condições hostis, no interior dos macrófagos. Os fármacos actualmente disponíveis não conjugam actividade com níveis de toxicidade e custos aceitáveis. Além disso, a emergência de resistência parasitária a fármacos anti-leishmaniais e a ausência de uma abordagem quimioterapêutica alternativa revelam uma necessidade em desenvolver novos fármacos ou novas estratégias para o tratamento desta doença.

As dinitroanilinas têm propriedades anti-leishmaniais, ligando-se preferencialmente às tubulinas dos parasitas. A orizalina (ORZ) é uma dinitroanilina que demonstrou ter actividade contra a *Leishmania infantum* *in vitro*. Contudo, a baixa solubilidade e a baixa pressão de vapor deste fármaco têm dificultado a sua aplicação como um agente anti-parasitário *in vivo*.

As potencialidades dos lipossomas como sistema transportador de fármacos, têm sido exploradas com êxito, proporcionando um aumento da eficácia terapêutica de diversos fármacos. Além disso, a captação preferencial das formulações lipossómicas pelos macrófagos abre importantes perspectivas para o tratamento de *Leishmania* com ORZ. O objectivo da presente dissertação consistiu no desenvolvimento, caracterização e optimização de formulações lipossomais contendo ORZ, a fim de estudar a estabilidade destes sistemas em soro fisiológico e em albumina sérica bovina (BSA) para futuro teste de actividade *in vivo*.

**keywords**

visceral leishmaniasis, parasite's life cycle, treatment, dinitroanilines, ORZ liposomes, animal model.

**abstract**

The leishmaniasis represents endemic infection that afflicts the world's poorest populations. Currently, the leishmaniasis is considered to be endemic in 88 countries and an estimated 12 million people are infected. Worldwide, there are 2 million new cases each year and 1/10 of the world's population is at risk of infection. However, leishmaniasis has recently emerged as a very important cause of opportunistic infections for individuals positive for human immunodeficiency virus (HIV) in many parts of the world. The leishmaniasis can be divided into 3 major clinical syndromes: cutaneous, mucocutaneous and visceral leishmaniasis. Visceral leishmaniasis is a several vector-borne disease caused by a protozoan growth of the *Leishmania donovani* and *Leishmania infantum* complex within reticuloendothelial cells throughout the body. An insect vector transmits the parasite from person to person or via an animal reservoir. These parasites have developed a variety of adaptive mechanisms not only to live inside the vector, but also to evade the vertebrate host immune responses, including survival within the host macrophage. The available drugs do not conjugate high activity with acceptable toxicity at moderate costs. Moreover, the emergence of parasite resistance to anti-leishmanial drugs and the absence of an alternative chemotherapeutic approach reveal the necessity to develop new drugs for the treatment of this disease.

Dinitroanilines are tubulin-binding agents with reported anti-leishmanial properties *in vitro*. Oryzalin (ORZ) is a dinitroaniline that proved to have activity against *Leishmania infantum*. However, its therapeutic application is severely restricted by its low water solubility and low vapor pressure, two features that have created problems in their development as anti-parasitic agent *in vivo*. The potential use of liposomes as drug carriers has been exploited with success to enhance the efficiency of several drugs. Furthermore, the preferential uptake of liposomes by macrophages opens some important perspectives for the treatment of *Leishmania* with ORZ.

The aim of the present thesis was the development, characterization and optimization of liposomal formulations containing ORZ, in order to study the ORZ liposomes stability in physiologic serum and bovine serum albumin (BSA) for further tests *in vivo*.

Ao Carlos do Vale, ao Rui Lopes e ao Jorge Faustino pelas conversas amenas, pelo óptimo convívio, camaradagem e acima de tudo pelo respeito e pela amizade. Também queria agradecer ao Jorge Faustino pela aprendizagem e ajuda indispensável na realização das experiências com animais.

À Professora Sónia Mendo pelo interesse demonstrado quanto ao meu futuro e formação.

À Engenheira Bárbara Martins pela simpatia e pelas conversas agradáveis nos poucos momentos de convivência.

As funcionárias do INETI, Dra. São e D. Alzira, pela agradável convivência e por serem sempre tão atenciosas e disponíveis.

Agradeço, acima de tudo, aos meus pais, que sempre me incentivaram a seguir os meus ideais. Serei eternamente grato por tudo o que eles me proporcionaram e também por me terem ajudado a chegar até aqui.

À D. Guiomar pela sua preocupação com o meu bem-estar durante a minha estadia em Lisboa.

À Dra. Conceição Faria, Dra. Lucinda Vasconcelos e a todo o pessoal do laboratório de patologia clínica do Hospital distrital de Macedo Cavaleiros não só pela amizade, mas também pelos conhecimentos valiosos na área da microbiologia, bioquímica e imunologia clínica. Em particular, à Dra. Lucinda Vasconcelos por me ter permitido a realização do meu ano curricular de mestrado.

Aos meus amigos João Limão, João Tadeia, Cláudio Maia, Pedro Rodrigues, Carlos Vaz, Jorge Bruno e Miguel Batista não só pela amizade, mas também pelas conversas e pelos óptimos momentos que passamos juntos.

À Liliana pelo apoio, compreensão, incentivo e por ter estado sempre ao meu lado.





# ÍNDICE

ÍNDICE DE TABELAS .....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xii
ABREVIATURAS .....	xv
<b>I. - INTRODUÇÃO.....</b>	<b>I</b>
1 - A DOENÇA: LEISHMANIOSE.....	3
1.1 - CICLO DE VIDA da <i>Leishmania sp</i> .....	7
1.2 - TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE .....	11
2 - O FÁRMACO: ORIZALINA .....	14
3 - O VEÍCULO: LIPOSSOMA.....	18
3.1 - HISTÓRIA .....	18
3.2 - DEFINIÇÃO .....	19
3.3 - COMPONENTES DOS LIPOSSOMAS .....	20
3.4 - ORGANIZAÇÃO MOLECULAR DOS FOSFOLÍPIDOS .....	23
3.5 - PROPRIEDADES FUNDAMENTAIS DOS LIPOSSOMAS.....	25
3.6 - CLASSIFICAÇÃO DOS LIPOSSOMAS.....	26
3.6.1 - Classificação com base no diâmetro médio e no número de bicamadas.....	27
3.6.2 - Classificação com base na constituição membranar e comportamento <i>in vivo</i> .....	28
3.6.3 - Classificação com base no método de preparação .....	31
3.7 - PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS LIPOSSOMAS .....	35
3.7.1 - Temperatura de transição de fase ( $T_f$ ) .....	35
3.7.2 - Carga superficial .....	37
3.7.3 - Presença de colesterol .....	37
3.8 - ESTABILIDADE DOS LIPOSSOMAS .....	38
3.8.1 - Estabilidade física .....	39
3.8.2 - Estabilidade química .....	40
3.9 - INTERACÇÃO LIPOSSOMA-CÉLULA .....	41
3.9.1 - Transferência intermembranar .....	42

3.9.2 - Adsorção .....	42
3.9.3 - Fusão .....	43
3.9.4 - Fagocitose/endocitose .....	43
<b>II. - OBJECTIVOS.....</b>	<b>45</b>
1 - OBJECTIVO GERAL.....	47
2 - OBJECTIVOS ESPECÍFICOS .....	47
<b>III. - PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>49</b>
1 - ESQUEMA DO TRABALHO REALIZADO .....	51
2 - MATERIAL E MÉTODOS .....	52
2.1 - LÍPIDOS E REAGENTES.....	52
2.2 - MÉTODOS DE DOSEAMENTO E PARÂMETROS UTILIZADOS PARA A CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES .....	52
2.2.1 - Doseamento de Orizalina por um método espectrofotométrico.....	53
2.2.2 - Doseamento de fosfolípidos pelo método de Rouser .....	57
2.2.3 - Determinação do diâmetro médio dos lipossomas .....	60
2.2.4 - Determinação do potencial zeta dos lipossomas .....	62
2.3 - METODOLOGIAS DE PREPARAÇÃO DE LIPOSSOMAS .....	64
2.3.1 - Preparação de VET's com ORZ.....	64
2.3.2 - Preparação de DRV's com ORZ .....	66
2.4 - DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE DE UMA SUSPENSÃO LIPOSSÓMICA CONTENDO ORIZALINA.....	68
2.4.1 - Estabilidade a 4 °C .....	68
2.4.2 - Estabilidade a 37 °C .....	68
2.5 - ESTABELECIMENTO DO MODELO ANIMAL DE LEISHMANIOSE VISCERAL.....	69
2.4.1 - Animais .....	69
2.4.2 - Inoculação da estirpe <i>L. infantum</i> - MON-1(MCAN/PT/94/IMT 205) .....	70
2.4.3 - Estudos parasitológicos .....	70
<b>IV. - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>75</b>
1 - ESTUDO DOS FACTORES DETERMINANTES PARA A INCORPORAÇÃO DA ORIZALINA EM LIPOSSOMAS.....	77

1.1- COMPOSIÇÃO LIPÍDICA .....	77
1.2 - INFLUÊNCIA DO MÉTODO DE PREPARAÇÃO NOS PARÂMETROS DE INCORPORAÇÃO DE ORZIZALINA EM LIPOSSOMAS .....	80
1.3 - ESTUDO DE SATURAÇÃO DE INCORPORAÇÃO DE FÁRMACO .....	83
1.4 - ESTUDO DO EFEITO DO FOSFATIDILGLICEROL NA BICAMADA LIPOSSÓMICA .....	86
2 - ESTUDO DA ESTABILIDADE DE UMA SUSPENSÃO LIPOSSÓMICA CONTENDO ORIZALINA .....	88
2.1 - ESTABILIDADE A 4 °C .....	88
2.2 - ESTABILIDADE A 37 °C .....	92
3 - AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE BIOLÓGICA.....	97
<b>V. - CONCLUSÃO.....</b>	<b>99</b>
<b>VI. - BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>105</b>
<b>VII. - ANEXOS.....</b>	<b>125</b>

# ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I. 1. - Espécies do género <i>Leishmania</i> pertencentes aos subgéneros <i>Leishmania</i> e <i>Viannia</i> no Velho e no Novo Mundo.....	6
Tabela I. 2. - Estrutura química de antimoniais pentavalentes utilizados no tratamento da leishmaniose.....	12
Tabela I. 3. - Outros fármacos utilizados na terapia da leishmaniose.....	13
 Tabela III. 1. - Preparação da curva de calibração para o doseamento de ORZ por espectrofotometria directa.....	56
Tabela III. 2. - Etapas para a quantificação espectrofotométrica de fosfolípidos constituintes dos lipossomas.....	59
Tabela III. 3. - Material e reagentes utilizados para o estudo parasitológico.....	71
 Tabela IV. 1. - Efeito da composição lipídica nos parâmetros de incorporação de lipossomas (VET's) contendo ORZ <sup>(1)</sup> .....	78
Tabela IV. 2. - Efeito da composição lipídica na carga superficial dos lipossomas.....	78
Tabela IV. 3. - Influência do método de preparação nos parâmetros de incorporação de ORZ em lipossomas <sup>(1)</sup> .....	81
Tabela IV. 4. - Diâmetro médio e potencial Zeta dos lipossomas <sup>(1)</sup> nos métodos 1, 2 e 3.....	83
Tabela IV. 5. - Efeito da razão inicial ORZ/lípido nos rendimentos de ORZ e lípido, na ORZ incorporada e na eficiência de incorporação.....	84
Tabela IV. 6. - Efeito do PG em lipossomas (DRV's) com ORZ <sup>(1)</sup> .....	86
Tabela IV. 7. - Estabilidade em soro fisiológico <sup>(1)</sup> , à temperatura de 4 °C, de formulações lipossomais de ORZ.....	90
Tabela IV. 8. - Estabilidade a 37 °C em BSA <sup>(1)</sup> de formulações lipossomais de ORZ.....	94
 Tabela VII. 1. - Tabela onde se efectuaram as anotações durante a realização da experiência <i>in vivo</i> .....	134

# ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I. 1. - Distribuição geográfica da LV, segundo a OMS. ....	5
Figura I. 2. - (a) <i>P. dubosci</i> (W.H.O. - TDR image library). (b) Tracto alimentar de um flebotomidio, evidenciando locais de desenvolvimento de <i>Leishmania sp.</i> .....	7
Figura I. 3. - Ciclo de vida da <i>Leishmania</i> . ....	8
Figura I. 4. - Formas morfológicas do protozoário <i>Leishmania</i> . Diferentes estadios de diferenciação durante o ciclo de vida. ....	10
Figura I. 5. - Polimerização (+) e despolimerização (-) do microtúbulo. ....	15
Figura I. 6. - Fórmula estrutural geral de uma dinitroanilina. ....	16
Figura I. 7. - Estruturas químicas e compostos comerciais de dinitroanilinas. ....	16
Figura I. 8. - Localização de agentes bioactivos nos lipossomas. ....	20
Figura I. 9. - Estrutura química e características físico-químicas de alguns fosfolípidos utilizados na preparação de lipossomas. ....	22
Figura I. 10. - Estrutura química de algumas moléculas hidrossolúveis (R). ....	23
Figura I. 11. - Representação esquemática de estruturas lipídicas em soluções aquosas:.....	24
Figura I. 12. - Esquema representativo das várias utilizações dos lipossomas e inter-relação entre os diversos parâmetros que os caracterizam.....	26
Figura I. 13. - Tipos de lipossomas com base no seu diâmetro médio e número de bicamadas. ....	28
Figura I. 14. - Quatro diferentes classes de lipossomas com base na sua composição. ....	30
Figura I. 15. - Representação esquemática das metodologias de preparação de MLV's, LUV's, VET's e SUV's. ....	31
Figura I. 16. - Representação esquemática das etapas de preparação de MLV's e LUV's. ....	32
Figura I. 17. - Extrusão de MLV's para obtenção de VET's ou LUV's. ....	33
Figura I. 18. - Fluxograma de alguns métodos de preparação de vesículas transportadoras de um fármaco hidrófobo. ....	34
Figura I. 19. - Fases de transição apresentadas pela membrana consoante a temperatura a que se encontra. Bicamada lipídica visão de topo (a) e visão lateral (b). Diferentes tipos de bicamadas lipídicas de um lipossoma (c). ....	36
Figura I. 20. - Representação esquemática dos 4 tipos de mecanismos de interacção lipossoma - célula: a) adsorção; b) fagocitose/endocitose;.....	41
Figura III. 1. - Lípidos comerciais utilizados na preparação de lipossomas. ....	52
Figura III. 2. - Espectrofotómetro Shimadzu UV-160A com posicionador/termostatizador incorporado modelo CPS-240A (Japão). ....	53

Figura III. 3. - Espectro de absorção de orizalina com uma concentração de 5 g/mL, (concentração teórica de ORZ, após diluição de 1/60) obtido por varrimento de comprimento de onda entre 190 e 850nm. ....	54
Figura III. 4. - Espectro de absorção de lipossomas vazios de composição lipídica PC:PG (4:1), com uma concentração de 0,17 mol/mL (concentração dos lipossomas após diluição de 1/60), obtido por varrimento de comprimento de onda entre 190 e 850 nm. ....	54
Figura III. 5. - Espectro de absorção de uma solução de 20 % (v/v) de acetonitrilo e 80 % (v/v) de água, obtido por varrimento de comprimento de onda entre 190 e 850 nm. ....	55
Figura III. 6. - Curva de calibração obtida pela leitura de absorvância a 284 nm de várias soluções de ORZ dissolvidas em 20 por cento de acetonitrilo e 80 por cento de água. ....	56
Figura III. 7. - Representação esquemática das etapas de doseamento de fosfolípidos pelo método de Rouser. ....	60
Figura III. 8. - Aparelho de determinação de tamanho de partículas Zeta Sizer 1000 HSA (Malvern Instruments ,Reino Unido). ....	61
Figura III. 9. - Exemplo de um relatório impresso após a determinação do diâmetro médio de uma população de lipossomas. ....	62
Figura III. 10. - Exemplo de um relatório impresso após a determinação do potencial zeta de uma população lipossomal. ....	63
Figura III. 11. - a) peças do Extruder. b) disposição de todas as peças para montagem do Extruder Lipex Biomembranes (Vancouver, Canadá). ....	64
Figura III. 12. - Etapas de preparação de VET's. ....	65
Figura III. 13. - Etapas de preparação de DRV's com ORZ. ....	67
Figura III. 14. - Murganho BALB/c infectado por i.p. com $1 \times 10^6$ promastigotas. ....	70
Figura III. 15. - Esquematização das etapas do método de impressões em lâmina. ....	72
Figura III. 16. - Esquematização das etapas do método de diluição limite. ....	74
Figura IV. 1. - Efeito da composição lipídica nos rendimentos do processo e na incorporação de ORZ em lipossomas. ....	79
Figura IV. 2. - Influência do método de preparação na E.I., no $\eta$ (ORZ) e no $\eta$ (Lip). ....	82
Figura IV. 3. - Representação da curva de saturação e da eficiência de incorporação da ORZ. ....	85
Figura IV. 4. - Efeito do PG no diâmetro médio e no potencial zeta de DRV's contendo ORZ ....	87
Figura IV. 5. - Retenção de ORZ nas vesículas e variação do lípido total ao longo do tempo. ....	89
Figura IV. 6. - Representação gráfica da variação dos diâmetros médios das vesículas em soro fisiológico, ao longo do tempo. ....	92
Figura IV. 7. - Retenção de ORZ nas vesículas e variação do lípido total ao longo do tempo. ....	95
Figura IV. 8. - Representação gráfica do potencial zeta de formulações, recém preparadas e em BSA durante 24 horas, e da variação do diâmetro médio das vesículas ao longo do tempo. ....	96

Figura IV. 9. - Imagens de impressões de baço coradas com solução Giemsa, visualizadas ao microscópio óptico: .....	97
Figura VII. 1. - Espectros de absorção de diferentes soluções, obtidos por varrimento de comprimento de onda entre 190 e 850nm, em diferentes condições experimentais. ....	128
Figura VII. 2 - Curvas padrão de ORZ com diferentes concentrações de acetonitrilo na presença ou ausência de TFA.....	129
Figura VII. 3 - Curvas padrão de ORZ com diferentes concentrações de acetonitrilo na presença de lipossomas vazios. ....	129
Figura VII. 4 - Resultados da análise estatística ANOVA para análise da variância das principais curvas padrão. ....	131
Figura VII. 5 - Microplaca com meio NNN.....	132



## ABREVIATURAS

<b>Aext</b>	Amostra após extrusão dos lipossomas
<b>Af</b>	Amostra final após centrifugação dos lipossomas
<b>Ai</b>	Amostra inicial após hidratação do filme lipídico
<b>Aliof</b>	Amostra após hidratação dos liofilizados
<b>Am</b>	amostra
<b>BSA</b>	albumina sérica bovina
<b>Cf</b>	concentração final
<b>Chol</b>	colesterol
<b>Ci</b>	concentração inicial
<b>CO<sub>2</sub></b>	dióxido de carbono
<b>DOPC</b>	dioleoilfosfatidilcolina
<b>DOPG</b>	dioleoilfosfatidilglicerol
<b>DRV's</b>	vesículas preparadas por desidratação e re-hidratação
<b>E.I.</b>	eficiência de incorporação
<b>FBS</b>	soro fetal bovino
<b>F.D.A.</b>	food and drug administration
<b>GM<sub>1</sub></b>	monossialogangliósido
<b>HIV</b>	vírus de imunodeficiência humana
<b>H<sub>2</sub>Od</b>	água desmineralizada
<b>i.p.</b>	via intraperitoneal
<b>Lip(i)</b>	lípidio inicial
<b>Lip(f)</b>	lípidio final
<b>LUV's</b>	vesículas unilamelares grandes
<b>LV</b>	leishmaniose visceral
<b>MLV's</b>	vesículas multilamelares
<b>MP</b>	matriz peritrófica
<b>η(ORZ)</b>	rendimento de orizalina
<b>η(Lip)</b>	rendimento de lípidio
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>ORZ</b>	orizalina

<b>ORZ(i)</b>	orizalina inicial
<b>ORZ(f)</b>	orizalina final
<b>ORZ/Lip</b>	razão molar de orizalina/lípido
<b>ORZ/Lip](i)</b>	concentração da razão inicial orizalina/lípido
<b>[ORZ/Lip](f)</b>	concentração da razão final orizalina/lípido
<b>Osm</b>	Osmolaridade
<b>PC</b>	fosfatidilcolina
<b>PCR</b>	reacção de polimerase em cadeia (polymerase chain reaction)
<b>PE</b>	fosfatidiletanolamina
<b>PEG</b>	polietilenoglicol
<b>PG</b>	fosfatidilglicerol
<b>PI</b>	fosfatidilinositol
<b>PS</b>	fosfatidilserina
<b>SA</b>	estearilamina
<b>Schneider FBS</b>	meio de cultura Schneider para Insectos, suplementado com soro fetal bovino
<b>SIDA</b>	síndrome de imunodeficiência adquirida
<b>SMF</b>	sistema mononuclear fagocitário
<b>SUV's</b>	vesículas unilamelares pequenas
<b>TFL</b>	trifluralina
<b>Tt</b>	temperatura de transição de fase
<b>VET's</b>	vesículas obtidas por técnicas de extrusão
<b>Vi</b>	volume inicial
<b>Vf</b>	volume final

# **I. - INTRODUÇÃO**



## 1 – A DOENÇA: LEISHMANIOSE

A leishmaniose é uma doença de carácter zoonótico de ampla distribuição geográfica, ocorrendo predominantemente nas regiões tropicais e subtropicais [1; 2]. Esta doença é endémica em cerca de 88 países, dos quais 72 são países em desenvolvimento. Estima-se que cerca de 12 milhões de pessoas estejam infectadas e cerca de 350 milhões em risco de infecção [1; 3], pelo que a leishmaniose foi uma das seis doenças declaradas como prioritárias em 1984 pela Organização Mundial de Saúde (OMS) [4]. Calcula-se que existam de 400,000 a 2,000,000 novos casos por ano [5].

As manifestações clínicas da leishmaniose são variáveis e dependem da associação entre as características de virulência da espécie de *Leishmania* infectante e da resposta imunológica do hospedeiro [6]. De acordo com as manifestações clínicas, a leishmaniose pode ser classificada em três grupos: leishmaniose cutânea, leishmaniose mucocutânea e leishmaniose visceral. A leishmaniose cutânea caracteriza-se por úlceras crónicas na pele, desenvolvidas no local da picada do insecto vector e que podem levar meses para cicatrizar. A leishmaniose mucocutânea causa, no início, úlceras na pele semelhantes às da leishmaniose cutânea que, entretanto, cicatrizam, para depois reaparecerem, principalmente nas mucosas do nariz e da boca. É geralmente acompanhada por infecções secundárias e destruição de grandes extensões de tecido. A leishmaniose visceral (LV), também conhecida como Kala-azar, é uma doença sistémica muito grave, com migração dos parasitas para o fígado, baço e medula óssea, podendo levar o hospedeiro à morte [7]. As co-infecções, *Leishmania* – vírus da imunodeficiência humana (HIV), que ocorrem em cerca de 2 a 7 % dos pacientes com síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA), são frequentes em muitos países, especialmente no Brasil e na bacia mediterrânea (Espanha, Itália, França e Portugal), onde 20 a 70 % dos casos de LV adulta estão relacionados com infecções de HIV [8-12]. Para além disso a leishmaniose é uma doença oportunista em indivíduos imunodeprimidos ou em doentes com SIDA que acelera o desenvolvimento da SIDA e diminui a esperança de vida desses pacientes [11-13].

Baseados nas manifestações clínicas e na evolução da doença a partir do momento e local da inoculação do parasita pelo vector envolvido na transmissão, Marzochi e Marzochi (1994) propuseram uma classificação clínica da leishmaniose. Nesta classificação a LV apresenta 4 formas clínicas [14]:

- 1) Forma inaparente – Caracteriza-se pela ausência de sinais e sintomas clínicos, presença de anticorpos anti-leishmania e teste de Montenegro positivo. Esta forma pode estar relacionada com a fase inicial da doença.
- 2) Forma leve – Caracteriza-se pela ausência de sintomas ou, quando ocorrem, são difusos e dificilmente associados com a doença. Pode ocorrer uma discreta hepatoesplenomegalia. Esta forma pode evoluir para a forma moderada ou para a assintomática. O teste de Montenegro geralmente é positivo e a serologia também. Dificilmente é encontrado o parasita nos tecidos.
- 3) Forma moderada – Caracterizada por um historial clínico de febre, diarreia, podendo ocorrer ocasionalmente outras manifestações. Geralmente observa-se um estado clínico normal, sendo uma forma clínica discreta ou moderada hepatoesplenomegalia, serologia positiva e reacção intradérmica de Montenegro ocasionalmente positiva. Evidência do parasita na medula óssea e em outros órgãos.
- 4) Forma grave – Geralmente associada a um diagnóstico tardio onde o paciente refere um historial clínico com meses de evolução, manifestando uma baixa condição clínica, perda de peso, febre, palidez, diarreia, aumento do volume abdominal e outras manifestações. Observa-se hepatoesplenomegalia, hipoalbuminémia, alterações das funções hepáticas e renais. A progressão da doença leva à falência cardíaca, edema, evoluindo para icterícia e infecções bacterianas secundárias. Os títulos dos anticorpos estão bastante elevados e o teste de Montenegro é negativo. A morte geralmente surge de uma septicémia ou por hemorragia.

Segundo a OMS, noventa por cento dos casos de LV ocorrem sobretudo em cinco países: Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e Brasil (**Figura I. 1.**) [15].

Esta doença é causada por pelo menos 20 espécies de protozoários do género *Leishmania* pertencentes à ordem *Kinetoplastida* e à família *Tripanosomatidae* [16-19]. Lainson e Shaw (1987) propuseram a divisão do género *Leishmania* em dois subgéneros, *Leishmania* e *Viannia* (**Tabela I. 1.**), tendo como critérios de classificação: o desenvolvimento do parasita no seu vector natural, na pele de hamsters e em meio de

cultura agar sangue [20]. Do subgênero *Viannia* fazem parte as espécies dos complexos *Leishmania braziliensis* e *L. guyanensis*, que causam a leishmaniose cutânea e mucocutânea no Novo Mundo (América do Norte, do Sul e Central) como por exemplo, *L. (Viannia) guyanensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) paramensis*. Do subgênero *Leishmania* fazem parte as espécies do complexo *L. donovani* como por exemplo, *L. (Leishmania) chagasi* e *L. (L.) donovani*, responsáveis pela leishmaniose visceral no Novo e no Velho Mundo (Sul da Europa, África, Médio Oriente e Ásia), respectivamente, e do complexo *L. mexicana*, que incluem as espécies causadoras de leishmaniose cutânea e mucocutânea do Novo Mundo, como a *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) mexicana*. No subgênero *Leishmania* estão também incluídas espécies responsáveis pela leishmaniose cutânea do Velho Mundo, como a *L. (L.) major*, *L. (L.) tropica* e *L. (L.) aethiopica*, que taxonomicamente, não se enquadram em nenhum dos complexos citados (ver Tabela I. 1.) [17; 18; 21]. As diferentes manifestações clínicas são observadas nos dois mundos mas não são causadas pelas mesmas espécies de *Leishmania*. Por outro lado, dependendo da região, diferentes gêneros e espécies de flebotomídeos propagam o protozoário [21; 22]. Essa distribuição geográfica está limitada pela distribuição do seu vector, sua susceptibilidade a climas frios, altitude, humidade e vegetação, e ainda pela sua capacidade em suportar o desenvolvimento de espécies específicas de *Leishmania* (Figura I. 1.).



**Figura I. 1.** – Distribuição geográfica da LV, segundo a OMS.  
Fonte: <http://www.praticahospitalar.com.br>.

**Tabela I. 1.** – Espécies do género *Leishmania* pertencentes aos subgéneros *Leishmania* e *Viannia* no Velho e no Novo Mundo.

Subgénero	Complexo	Espécie	Distribuição geográfica
<i>Leishmania</i> (Ross, 1903)	Complexo <i>L. donovani</i>	- <i>L. (L.) donovani</i> (Laveran e Mesnil, 1903)	<b>Índia, China e Bangladesh</b>
		- <i>L. (L.) archibaldi</i> (Castellani e Chalmers, 1919)	<b>Sudão e Etiópia</b>
	Complexo <i>L. infantum</i>	- <i>L.(L.) infantum</i> (Nicolle, 1908)	<b>Centro Norte da Ásia, Médio Oriente, Sul da Europa, Noroeste da China e da África</b>
		- <i>L. (L.) chagasi</i> (Cunha e Chagas, 1937)	<b>América do Sul e Central</b>
	Complexo <i>L.tropica</i>	- <i>L. (L.) tropica</i> (Wright, 1903)	<b>Meios urbanos do Médio Oriente e da Índia</b>
		- <i>L. (L.) killicki</i> (Rioux, Lanotte e Pratlong, 1986)	<b>Tunisia</b>
	Complexo <i>L. major</i>	- <i>L. (L.) major</i> (Yakimoff e Schokbor, 1914)	<b>África, Médio Oriente, Ásia</b>
	Complexo <i>L.gerbilli</i>	- <i>L. (L.) gerbilli</i> (Wang, Qu e Guan, 1973)	<b>China e Mongolia</b>
	Complexo <i>L. arabica</i>	- <i>L. (L.) arabica</i> (Peters, Elbihari e Evans, 1986)	<b>Arábia Saudita</b>
	Complexo <i>L.aethiopica</i>	- <i>L. (L.) aethiopica</i> (Bray, Ashford e Bray, 1973)	<b>Etiópia e Quênia</b>
	Complexo <i>L.mexicana</i>	- <i>L. (L.) mexicana</i> (Biagi, 1953)	<b>México, Belize, Guatemala e Centro Sul dos Estados-Unidos</b>
		- <i>L. (L.) amazonensis</i> (Lainson e Shaw, 1972)	<b>Bacia Amazónica e Brasil</b>
		- <i>L. (L.) venezuelensis</i> (Bonfante-Garrido, 1980)	<b>Venezuela</b>
	Complexo <i>L. enrietti</i>	- <i>L. (L.) enrietti</i> (Muniz e Medina, 1948)	<b>Brasil</b>
<i>Viannia</i> (Lainson e Shaw, 1987)	Complexo <i>L.braziliensis</i>	- <i>L. (V.) braziliensis</i> (Viannia, 1911)	<b>Brasil</b>
		- <i>L. (V.) peruviana</i> (Velez, 1913)	<b>Oeste dos Andes</b>
	Complexo <i>L. guyanensis</i>	<i>L. (V.) guyanensis</i> (Floch, 1954)	<b>Guiana Francesa, Guiana e Suriname</b>
		<i>L. (V.) panamensis</i> (Laison e Shaw, 1972)	<b>Panamá e Costa Rica</b>

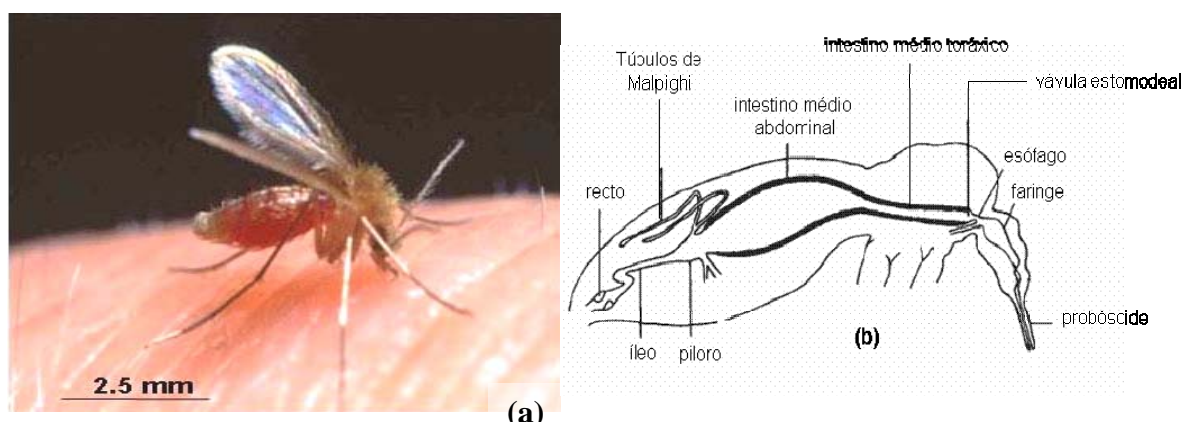
Fonte: Robert e Janovy (2000) [11].



## 1.1 – CICLO DE VIDA da *Leishmania sp*

A leishmaniose é uma doença transmitida por dípteros da família *Psychodida* dos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo), com vasta distribuição nos climas quentes e temperados (vectores) (**Figura I. 2.**). Somente as fêmeas são hematófagas [23]. Esta infecção surge como uma antroponose, onde o Homem é o reservatório, base e fonte de infecção para o vector (ciclo de transmissão Homem – vector – Homem) ou sob a forma de zoonose onde o reservatório é o animal (cães, roedores etc.) e está envolvido no ciclo de transmissão [15; 24].

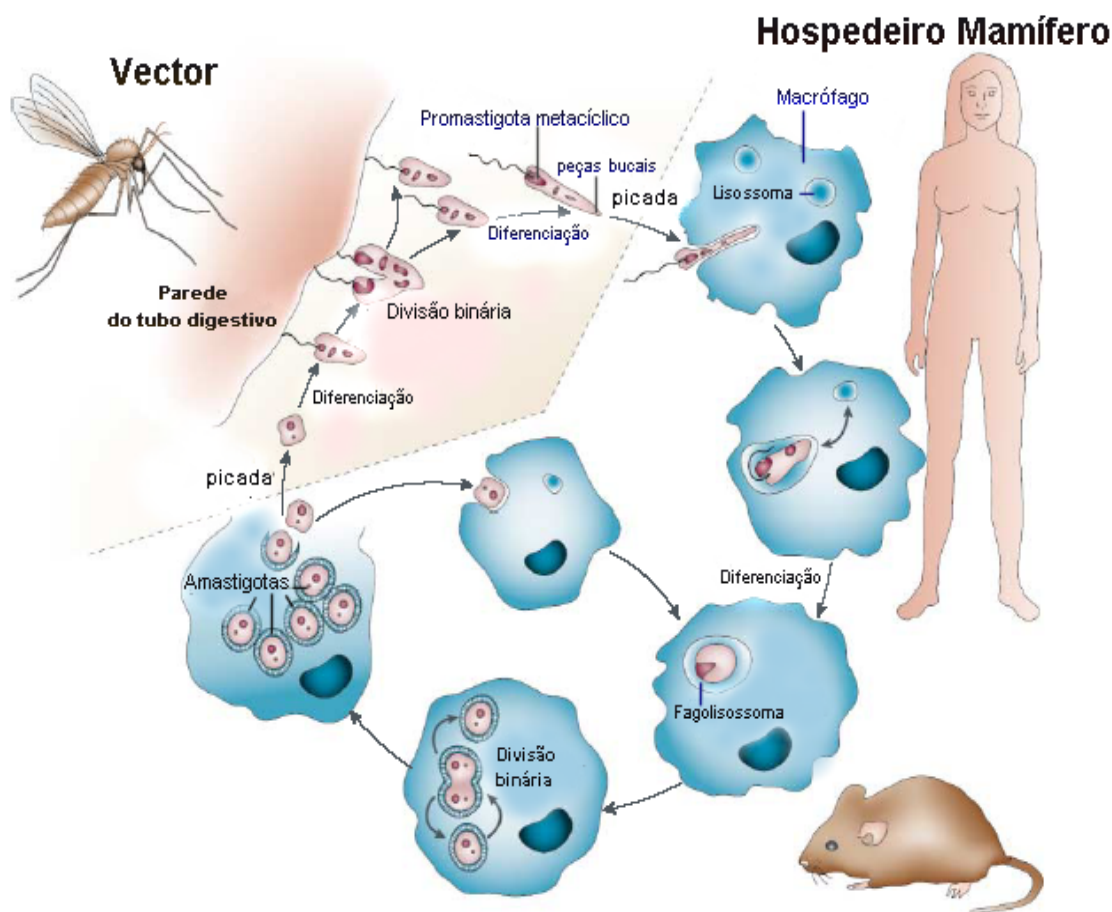
O parasita *Leishmania* tem um ciclo de vida dimórfico que necessita de dois hospedeiros, o flebotomídeo e um mamífero (**Figura I. 3.**) [25]. Durante o ciclo evolutivo, estes protozoários apresentam duas formas morfológicas: a amastigota intracelular presente em hospedeiros vertebrados (Homem, cães, gatos e roedores) e a promastigota presente no vector [26; 27]. As formas promastigotas são alongadas, flageladas, móveis e vivem no lúmen do tubo digestivo do mosquito, enquanto que as amastigotas são formas arredondadas, sem flagelo aparente, que infectam células do sistema mononuclear fagocitário (SMF) do hospedeiro vertebrado [28].



**Figura I. 2.** – (a) *P. duboski* (W.H.O. – TDR image library). (b) Tracto alimentar de um flebotomídeo, evidenciando locais de desenvolvimento de *Leishmania sp*. Adaptado de Killick-Kendrick (2002) [29].

Durante o repasto sanguíneo da fêmea flebotomídeo num hospedeiro infectado, são ingeridos macrófagos, contendo amastigotas [30]. Nas primeiras vinte e quatro horas as formas amastigotas ingeridas, diferenciam-se em promastigotas procíclicos (forma não infectante), reproduzindo-se rápida e intensamente por divisão binária no intestino médio [25; 27; 30]. Estes promastigotas permanecem em divisão no intestino médio, protegidos pela matriz peritrófica (MP) [28; 31]. Promastigotas com flagelos mais alongados e

infectantes (**Figura I. 4.**), designados por nectomonas, começam a surgir após 3 dias e acumulam-se na parte anterior da MP [25; 32; 33]. As nectomonas dividem-se em dois tipos, atendendo à função que desempenham. O primeiro, corresponde às nectomonas que se ligam às células epiteliais do intestino médio, inserindo os seus flagelos entre as microvilosidades [33-37]. O segundo, refere-se às nectomonas que propagam a infecção para a região anterior do intestino médio abdominal e são responsáveis pela colonização inicial do intestino médio torácico [32].

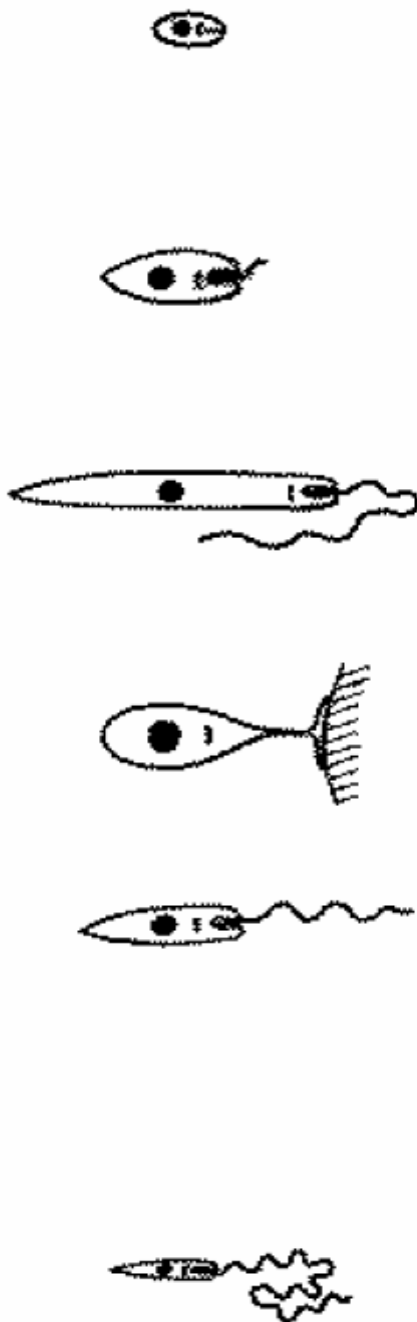


**Figura I. 3.** – Ciclo de vida da *Leishmania*.  
Adaptado de Sacks e Noben-Trauth (2002) [38].

Após 3 a 7 dias, ocorre a degeneração da MP. Então, as nectomonas (móveis) diferenciam-se em leptomonas e as nectomonas (ligadas às microvilosidades) diferenciam-se em haptomonas. As leptomonas são responsáveis por um segundo aumento da população parasitária, reproduzindo-se activamente (divisão binária) e ocupando o intestino médio torácico. Simultaneamente, as haptomonas migram para o segmento anterior do intestino médio até à válvula estomodeal (**Figura I. 2.**) [36]. A partir

do dia 5, ocorre a diferenciação das leptomonas em promastigotas metacíclicas, a forma infectante nos mamíferos. As leptomonas aderem à cutícula da válvula estomodeal, e os promastigotas metacíclicos migram para a região do esôfago, faringe e probóscide [25; 32-35; 39]. A intensa multiplicação associada ao bloqueio da válvula estomodeal provoca uma obstrução mecânica, dificultando a ingestão de sangue pelo insecto e obrigando-o a fazer várias picadas. Após cada novo repasto sanguíneo o relaxamento dos músculos responsáveis pela sucção provoca o refluxo dos parasitas, infectando o novo hospedeiro [27; 30; 40]. Deste modo, os promastigotas metacíclicos do flebotomídeo fêmea são directamente inoculados na circulação sanguínea do hospedeiro vertebrado [27]. Uma vez na circulação sanguínea, os promastigotas metacíclicos são fagocitados pelos macrófagos (resposta imunológica do hospedeiro) [30]. O parasita é capturado num vacúolo através da invaginação da membrana plasmática do macrófago [41]. Este vacúolo funde-se com lisossomas e endossomas de modo a formar um fagolisossoma [42]. Dentro dos fagolisossomas os promastigotas metacíclicos assumem a forma de amastigotas e passam a multiplicar-se por divisão binária até provocarem a lise dos macrófagos infectados, sendo libertados no espaço extracelular, onde são fagocitados por novos macrófagos e células do sistema mononuclear fagocitário (SMF) [30]. Assim, os parasitas são disseminados para o SMF, provocando então as lesões que vão caracterizar a doença [43]. O ciclo recomeça quando um flebotomídeo fêmea pica um hospedeiro infectado [30].

Como muitos parasitas protozoários, as espécies do género *Leishmania* possuem um ciclo de vida complexo caracterizado por uma sucessão de vários estádios de desenvolvimento especializados (**Figura I. 4.**), cada um dos quais essenciais para a conclusão do ciclo de vida [26; 44]. Os diferentes estádios do protozoário *Leishmania* podem ser identificados de acordo com a morfologia ou localização do parasita no tubo digestivo do vector, mas também pelas moléculas que constituem a sua superfície [21]. Estas características morfológicas e moleculares são mecanismos adaptativos que permitem a sobrevivência do parasita não só no vector, mas também na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado, conseguindo multiplicar-se em condições hostis, no interior de fagolisossomas. Os parasitas utilizam a resposta imunológica do hospedeiro para serem capturados pelos macrófagos. Uma vez fagocitados inibem enzimas hidrolíticas, vias de transdução de sinal, produção de citocinas e de óxido nítrico pelos macrófagos, etc., enfraquecendo a resposta imunológica inata e adquirida do hospedeiro, contribuindo para a sua sobrevivência [26].



#### **Amastigotas:**

- 1) São ovóides, não flagelados, sem mobilidade.
- 2) São ingeridos durante o repasto sanguíneo do vector.

#### **Promastigotas procíclicos:**

- 1) Células elipsóides, com tamanhos de 6 a 8  $\mu\text{m}$ . Têm pequenos flagelos.
- 2) São responsáveis pela expansão inicial da população parasita no intestino médio abdominal (divisão binária).

#### **Nectomonas:**

- 1) São formas alongadas de promastigotas procíclicos, sem capacidade de divisão. Têm tamanhos compreendidos entre 12 a 20  $\mu\text{m}$ ,
- 2) São responsáveis pelo estabelecimento da infecção no intestino médio torácico.

#### **Haptomonas:**

- 1) São parasitas com 5 a 8  $\mu\text{m}$ .
- 2) Possuem flagelos que se ligam à superfície cuticular da válvula estomodeal.

#### **Leptomonas:**

- 1) São células com 6 a 8  $\mu\text{m}$ .
- 2) Têm capacidade de replicação por divisão binária.
- 3) São responsáveis por um segundo aumento da população parasita no intestino médio torácico e no intestino anterior.

#### **Promastigotas metacíclicos:**

- 3) Possuem flagelos alongados.
- 4) Forma infectante nos mamíferos, com 5 a 8  $\mu\text{m}$ .

**Figura I. 4.** – Formas morfológicas do protozoário *Leishmania*. Diferentes estadios de diferenciação durante o ciclo de vida.  
Adaptado de Bates e Rogers (2004) [27].

## 1.2 – TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE

Em numerosas áreas geográficas, o aumento de factores de risco fazem da leishmaniose um problema de saúde pública [45].

O aparecimento de estirpes resistentes e a limitação de conhecimentos acerca dos mecanismos pelos quais os parasitas adquirem resistência são o maior obstáculo para o controlo desta doença [46]. Presentemente, não existe nenhum programa nacional ou internacional para prevenir a emergência de parasitas resistentes aos fármacos anti-leishmaniais. A OMS emitiu directrizes sobre o controlo da leishmaniose que incluem recomendações para o tratamento. Estas têm como intenção criar políticas comuns em áreas endémicas e melhorar o tratamento de doentes, as quais incluem a prevenção de recaídas e consequentemente a emergência de resistências secundárias. Em contrapartida, não referem a questão da resistência por si só [47]. É necessário um melhor conhecimento dos mecanismos de resistência e do mecanismo de acção dos leishmanicidas de modo a haver um uso mais racional destes fármacos, minimizar o desenvolvimento de resistência e conseguir tratamentos mais eficazes [48].

Devido à enorme diversidade de situações epidemiológicas, não há um diagnóstico, tratamento ou controlo único que se destine a todas estas situações. Os tratamentos que existem actualmente requerem a administração parentérica durante longos períodos de tempo e a maioria acarreta grandes despesas e têm efeitos secundários adversos em ambiente hospitalar [49; 50].

Presentemente, os agentes antimoniais pentavalentes na forma de Gluconato de antimónio sódico (Pentostam<sup>®</sup>) e Antimoniato de meglumina (Glucantime<sup>®</sup>) (**Tabela I. 2.**), continuam a ser os fármacos de primeira linha para o tratamento da LV, principalmente em indivíduos imunocompetentes que não residem em áreas com elevado risco de resistência a estes agentes [51; 52]. Após tratamento com este tipo de fármacos, verificou-se que para além dos parasitas serem cada vez mais resistentes (aparecimento de estirpes resistentes), surgiam efeitos adversos (toxicidade cardíaca e renal) [53-59]. Actualmente já é comum o aparecimento de parasitas *L.donovani* resistentes aos agentes antimoniais [60] e 50 – 80% dos casos de LV na Índia são resistentes ao Glucantime<sup>®</sup> [61; 62].

**Tabela I. 2.** – Estrutura química de antimoniais pentavalentes utilizados no tratamento da leishmaniose.

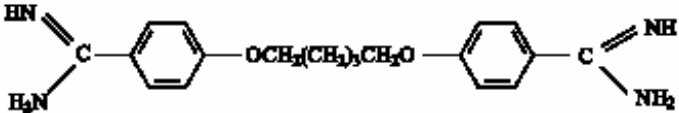
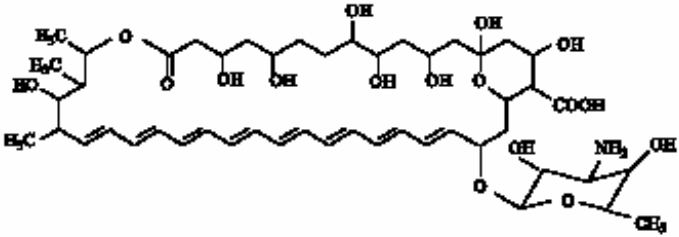
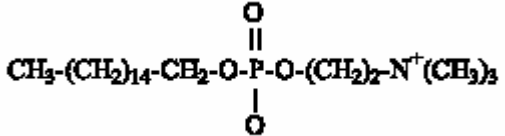
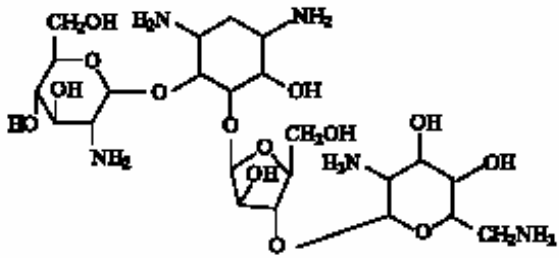
Fórmula estrutural	Nome químico	Nome comercial
$  \begin{array}{c}  \text{CH}_2\text{NHCH}_3^+ \\    \\  \text{HCOH} \\    \\  \text{HOCH} \\    \\  \text{HCOH} \\    \\  \text{HCOH} \\    \\  \text{CH}_2\text{OH}  \end{array}  \cdot (\text{OH})_2\text{Sb}_2\text{O}^-  $	Antimoniato de meglumina	Glucantime®
$  \left[ \begin{array}{ccc}  \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ \text{CHOH} \\ \text{HCO} \\ \text{HCO} \\ \text{HCO} \\ \text{COO}^- \end{array} & \begin{array}{c} \text{OH} \\ \text{O}^- \end{array} & \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ \text{CHOH} \\ \text{OCH} \\ \text{OCH} \\ \text{OCH} \\ \text{COO}^- \end{array} \\  \text{Sb} - \text{O} - \text{Sb} & &   \end{array} \right] \text{Na}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}  $	Gluconato de antimônio sódico ou Estibogluconato de sódio	Pentostam®

A ausência de resposta ao tratamento com agentes antimoniais pentavalentes teve um aumento súbito com o aparecimento de co-infecções *Leishmania*-HIV. Na Europa e no Brasil, indivíduos imunocomprometidos infectados com o complexo *L. infantum* normalmente apresentam resistência a estes agentes, ocorrendo recaídas frequentes [54; 63].

Como segunda linha de tratamento na ineficácia do tratamento com agentes antimoniais pentavalentes, incluem-se as Diamidinas Aromáticas (ex., Pentamidina), Aminosidina, Paromomicina, Anfotericina B e a Miltefosina (Tabela I. 3.). Apesar de serem mais eficazes na inibição da multiplicação do parasita, requerem longos períodos terapêuticos que induzem uma toxicidade superior à dos agentes antimoniais pentavalentes [55-58; 61; 64; 65]. Para diminuir esta toxicidade, algumas formulações lipídicas de Anfotericina B foram desenvolvidas, encontrando-se comercializadas (Ambisome®, Abelcet®, Amphotec®). No entanto os custos extremamente elevados destes produtos, não permitem o seu uso nos países em via de desenvolvimento [49].

Assim, torna-se necessário o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos que apresentem menor toxicidade, maior eficácia no tratamento e possam constituir uma alternativa para o tratamento de leishmaniose [46; 59; 66]. Tipos de fármacos como benzamidazoles e dinitroanilinas, devido aos seus efeitos inibitórios nos microtúbulos têm sido estudados como agentes leishmanicidas. As dinitroanilinas (ex., Trifluralina, Orizalina, Cloralina, etc.) são uma boa alternativa terapêutica, pelo facto de já ter sido demonstrado ausência de actividade contra células de mamíferos e a sua produção não ser dispendiosa [67-72].

**Tabela I. 3.** – Outros fármacos utilizados na terapia da leishmaniose.

Fórmula estrutural	Nome químico	Nome comercial
	Isetionato de pentamidina	Lomidina <sup>®</sup>
	Anfotericina B	Fungizone <sup>®</sup>
	Miltefosina	Impavido <sup>®</sup>
	Paromomicina	Humatin <sup>®</sup>

A eficácia dos fármacos é ainda limitada pela incapacidade de atingirem o alvo em concentrações suficientes. Na maioria dos casos e principalmente em infecções intracelulares, apenas uma pequena fracção consegue atingir os agentes patogénicos nos seus locais específicos, ficando a restante livre no organismo sem nenhum efeito benéfico [73]. Deste modo, são necessárias elevadas doses e longos períodos de administração para a quimioterapia ter algum efeito antiparasitário, levando ao rápido desenvolvimento de resistências. Estes inconvenientes podem ser reduzidos encapsulando o fármaco em formulações lipossomais [74; 75], que proporcionam uma redução da dosagem total para níveis mais tolerados. A eficácia é também significativamente melhorada pelo aumento da libertação do fármaco em doses mais concentradas na região alvo [75].

Uma vez que o cão é um dos principais hospedeiros da doença, principalmente do complexo *L. infantum* e tem um papel importante na transmissão para o Homem, era necessário a existência de tratamentos eficazes e, mais importante ainda, a necessidade de agentes preventivos. O cão, constitui também um excelente modelo para o estudo desta doença, visto apresentar sintomas similares aos desenvolvidos pelo Homem. Assim, ao alcançar alguns progressos no conhecimento da leishmaniose canina (ex., nos mecanismos de resistência do parasita e de acção dos leishmanicidas) irá ajudar significativamente na prevenção da leishmaniose humana [76; 77].

## 2 – O FÁRMACO: ORIZALINA

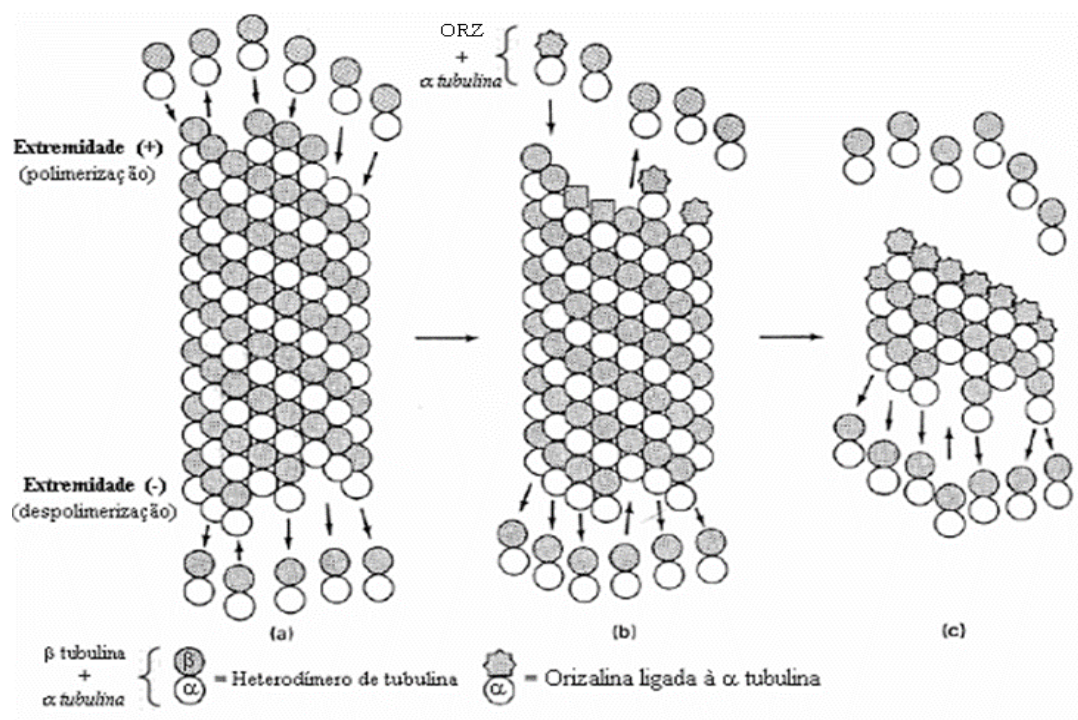
O parasita protozoário *Leishmania* possui na sua constituição microtúbulos com funções distintas:

- 1) Microtúbulos do flagelo associados à locomoção dos promastigotas;
- 2) Microtúbulos submembranares com funções na manutenção da forma da célula;
- 3) Microtúbulos do fuso mitótico responsáveis pela divisão celular [78-85];

Os microtúbulos são polímeros construídos a partir de heterodímeros de  $\alpha$  e  $\beta$  tubulinas (**Figura I. 5.**) [86; 87]. Estas tubulinas para além de serem as proteínas mais abundantes, são essenciais na diferenciação de amastigotas a promastigotas e para a sobrevivência do parasita [71]. Deste modo, é esperado que compostos que afectem o sistema microtubular tenham eficácia como agentes terapêuticos contra a leishmaniose



[88]. Assim, surgiu o desafio de identificar compostos específicos contra as tubulinas e que fossem simultaneamente inofensivos para os mamíferos.



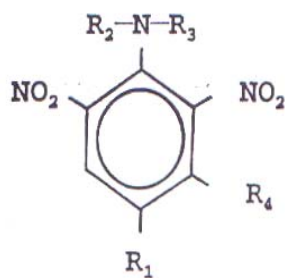
**Figura I. 5.** – Polimerização (+) e despolimerização (-) do microtúbulo.

Os heterodímeros de tubulina associam-se preferencialmente à extremidade (+) do microtúbulo (a). Quando o heterodímero é alterado pela ligação da orizalina às  $\alpha$  tubulinas, a associação na extremidade (+) é impedida; no entanto a dissociação na extremidade (-) não sofre alteração (b e c). Adaptado de Devine *et al.* (1993) [89].

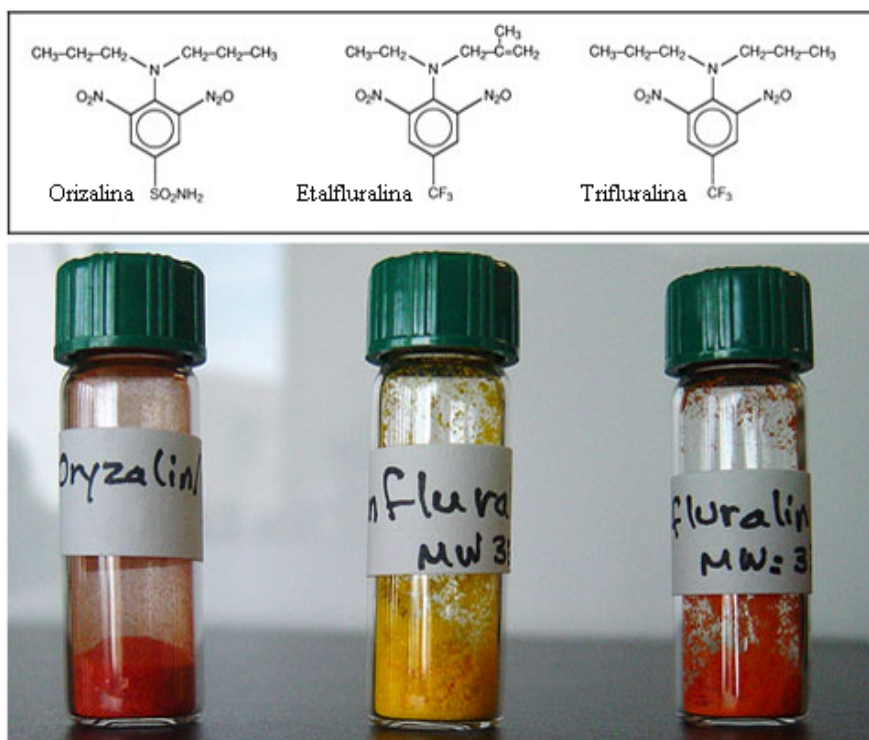
Muitos herbicidas inibem a mitose por interrupção da polimerização das tubulinas. A orizalina (ORZ) (3,5-dinitro- $N^4, N^4$ -dipropilsulfanilamida) e os seus análogos (**Figura I. 7.**) têm sido extensivamente usados na eliminação de ervas daninhas em campos relvados de futebol e golfe, assim como nos campos de cultivo [68; 90].

A ORZ pertence à classe das dinitroanilinas (ver **Figura I. 6.**), que como herbicidas, causam multinucleação, acumulação de células em prometáfase e a perda de microtúbulos de células [68; 90; 91]. As dinitroanilinas são constituídas por um anel benzeno, dois grupos  $\text{NO}_2$  e quatro grupos radicais ( $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  e  $R_4$ ) sendo, no caso da ORZ:

- $R_1$  -  $\text{SO}_2\text{NH}_2$ ;
- $R_2$  -  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ;
- $R_3$  -  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ;
- $R_4$  - H.



**Figura I. 6.** – Fórmula estrutural geral de uma dinitroanilina.  
 Fonte: Chan *et al.* (1993) [90].



**Figura I. 7.** – Estruturas químicas e compostos comerciais de dinitroanilinas.  
 Fonte: <http://morrissettelab.bio.uci.edu>.

A ORZ (Figura I. 5.) liga-se às  $\alpha$  tubulinas da *Leishmania* causando:

- 1) Inibição da multiplicação de promastigotas;
- 2) Abrandamento da diferenciação de amastigotas a promastigotas;
- 3) Redução na capacidade de infecção dos amastigotas [71];

Além de inibir a proliferação de *Leishmania*, estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a ORZ tem uma actividade antimicrotubular selectiva, ligando-se preferencialmente às tubulinas do parasita, não interferindo com as tubulinas ou microtúbulos de vertebrados [90-95]. Com este fármaco é possível erradicar o parasita minimizando os danos do hospedeiro vertebrado [96]. Deste modo, a ORZ apresenta-se como uma escolha plausível para o tratamento da leishmaniose.

No entanto, as propriedades químicas das dinitroanilinas surgem como uma limitação no desenvolvimento destes agentes anti-parasitários. A baixa solubilidade e baixa pressão de vapor dificultam a sua administração, sendo necessário desenvolver meios/formas de promover o transporte e a distribuição deste fármaco no organismo [96].

Os lipossomas, por serem biocompatíveis e biodegradáveis e não induzirem toxicidade, têm sido eleitos como sistemas de transporte de várias moléculas bioactivas, nomeadamente agentes anti-tumorais e anti-microbianos, hormonas, enzimas, antigénios e material genético [97-102].

Actualmente encontram-se plenamente demonstradas as vantagens da administração de formulações lipossomais de fármacos anti-fúngicos, como a anfotericina B, e de anti-tumorais, como a doxorrubina e daunorrubicina entre outras. Várias outras formulações lipossomais encontram-se em fase avançada de desenvolvimento, como por exemplo para a terapia de diversas formas de cancro, inflamações, infecções e vacinas.

Por estes motivos, e por se conhecer que, uma vez no organismo os lipossomas são preferencialmente capturados pelo fígado, baço e macrófagos, locais preferencialmente afectados pelos parasitas que causam LV, recorreu-se aos lipossomas como veículo natural de transporte da ORZ. A preferência do parasita *Leishmania* pelos macrófagos faz deles um alvo ideal para fármacos incorporados em lipossomas, que por endocitose entram nos macrófagos, colocando o agente terapêutico em contacto directo com o parasita localizado intracelularmente.

## 3 – O VEÍCULO: LIPOSSOMA

### 3.1 – HISTÓRIA

Ao longo dos tempos, a utilização da maioria dos compostos terapêuticos tem sido sempre limitada pela impossibilidade de aumento da sua dosagem. A retenção ou degradação do agente terapêutico, baixa solubilidade e, em especial, os efeitos colaterais perniciosos inerentes à sua utilização em concentrações elevadas, tornam muitas vezes difícil a utilização da dosagem necessária para que este cumpra a sua função. Este problema levou a que, durante o século XX, e em especial no decorrer das últimas décadas, tenha sido levado a cabo um grande esforço no sentido de desenvolver sistemas capazes de transportar compostos terapêuticos (agentes bioactivos, em especial os dirigidos a tumores, antibióticos, anti-parasitários, enzimas, hormonas, agentes quelantes ou material genético) até ao alvo específico (orgão, tecido ou célula).

A primeira proposta de um sistema direccionado de transporte de fármacos data do início do século XX [103], quando Paul Ehrlich propôs o seu modelo, que ficou conhecido por “bala mágica de Ehrlich” (*Ehrlich’s Magic Bullet*). Neste modelo, o fármaco é ligado ao transportador direccionado, e idealmente exhibirá a sua actividade farmacológica apenas no tecido alvo. Assim, os efeitos indesejáveis resultantes da sua acção em outros tecidos são largamente diminuídos, enquanto o aumento de eficiência permite o decréscimo da dose administrada. Porém, por mais atractivos e simples que possam parecer os conceitos de Ehrlich, são muito poucos os sucessos até agora obtidos [104; 105].

As primeiras tentativas para a obtenção de um sistema de transporte eficaz tiveram como base o encapsulamento das biomoléculas a transportar em vesículas de nylon e outros polímeros sintéticos [106-108]. Contudo, esta abordagem mostrou-se totalmente inadequada, visto estas vesículas de material artificial se acumularem no organismo.

O primeiro grande passo em frente nesta área deu-se em 1965, com a publicação por Alec Bangham e colaboradores de um trabalho de investigação fundamental, onde demonstraram a formação espontânea de cristais líquidos, por dispersão de lecitina do ovo em água e estudaram as suas propriedades físico-químicas [109]. Neste trabalho foi feita a caracterização de um sistema de vesículas fosfolipídicas, na altura coloquialmente

conhecidas por “Bangassomas”, embora sem qualquer ligação imediata aos estudos de sistemas transportadores de fármacos. Três anos mais tarde, seriam denominados por lipossomas, por sugestão de Sessa e Weissman [110], designação baseada nas palavras gregas para corpo (soma) e lipídico (lipo).

Após o trabalho de Bangham, os lipossomas impuseram-se como um sistema modelo simples para o estudo de membranas biológicas, sendo um dos modelos membranares mais utilizados em investigação fundamental [111-113]. O sucesso na incorporação de enzimas em lipossomas [114] despertou também o interesse da comunidade científica para a sua aplicação médica e farmacológica. Em 1971, Gregoriadis e Ryman propuseram pela primeira vez a utilização dos lipossomas como sistema transportador de fármacos anti-cancerígenos e anti-microbianos [115-117], mantendo um papel preponderante no desenvolvimento desta área. Desde então, numerosos estudos sobre a sua aplicabilidade como veículos de diversos agentes bioactivos têm tido lugar, levando à publicação de uma vasta literatura científica e à constituição de empresas dedicadas à investigação, teste e comercialização de lipossomas. Destas, destacam-se como pioneiras a Liposome Company e a Liposome Technology Inc., fundadas nos anos oitenta, às quais outras se seguiram [118].

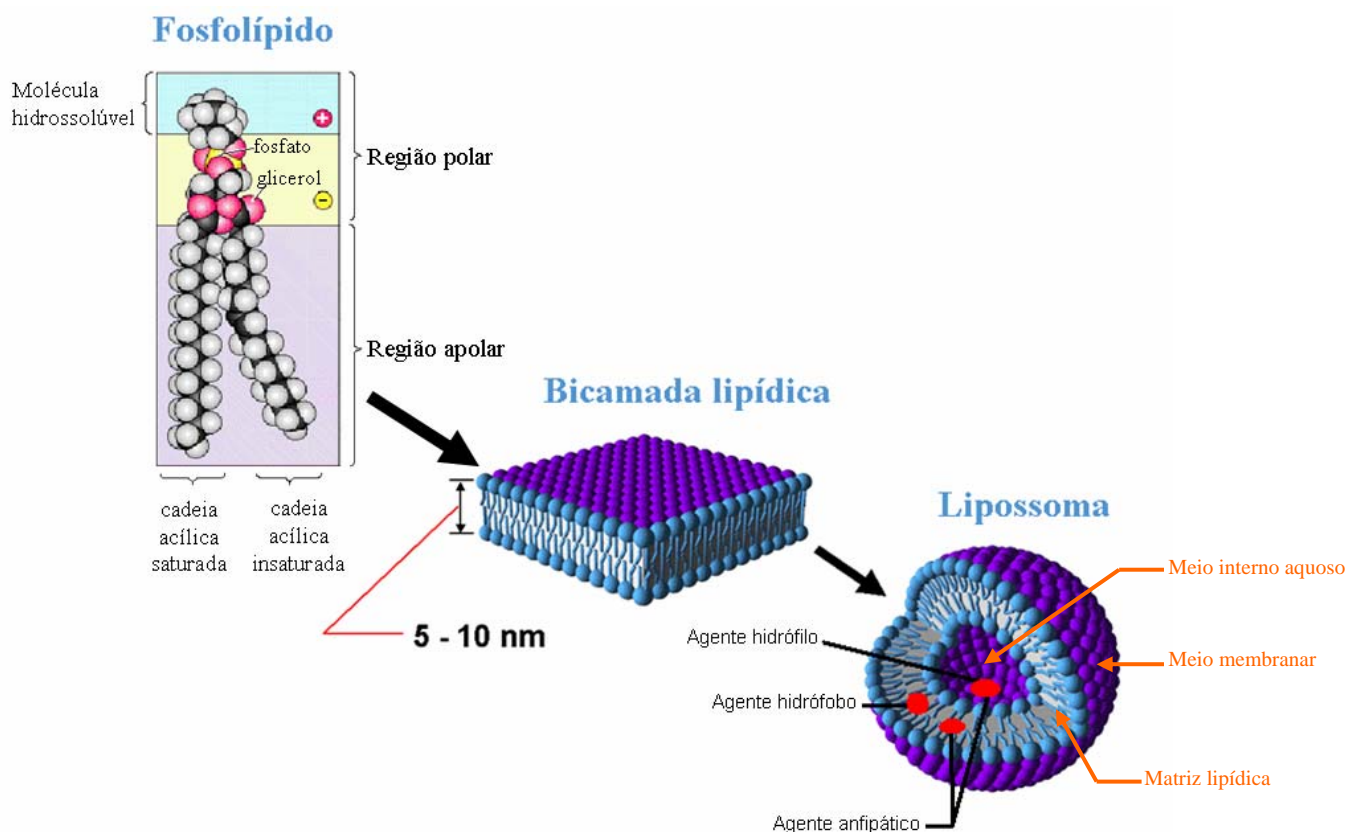
Os lipossomas são um caso modelo de um sistema que teve uma passagem rápida do campo da investigação para a aplicação comercial, quer na cosmética, quer na biomédica (**Figura I. 12.**) [119-123].

Esta actividade culminou com a aprovação pela Food and Drug Administration (F.D.A.) da comercialização de formulações lipossomais para fins terapêuticos [124].

### 3.2 – DEFINIÇÃO

Os lipossomas podem ser definidos como associações de natureza coloidal de lípidos anfipáticos, que se organizam espontaneamente em bicamadas concêntricas (estruturas fechadas tipo concha esférica), com diâmetros compreendidos entre 0,01 e 5,0  $\mu\text{m}$  ou até superiores [97; 125; 126]. A natureza anfipática das bicamadas lipídicas fechadas com uma matriz hidrófoba assegura a incorporação de um compartimento aquoso no interior das mesmas, tal como esquematizado na **Figura I. 8.** A presença de dois meios diferentes no sistema transportador, o aquoso (meio interno) e o membranar, fazem dos lipossomas um modelo único para o estudo de membranas biológicas e um

sistema de transporte versátil dado que pode transportar um largo espectro de agentes hidrófilos, hidrófobos e anfipáticos (**Figura I. 8.**) [127-131]. Os agentes hidrófilos incorporados permanecem no compartimento interno aquoso, os hidrófobos na matriz lipídica e os anfipáticos distribuem-se em ambos os locais do lipossoma [132].



**Figura I. 8.** – Localização de agentes bioactivos nos lipossomas.  
Adaptado: <http://www.nanonet.go.jp>.

### 3.3 – COMPONENTES DOS LIPOSSOMAS

Os lipossomas podem ser preparados a partir de misturas lipídicas extraídas de fontes naturais e purificadas, ou a partir de lípidos sintéticos puros, disponíveis comercialmente [125].

Os fosfolípidos são ésteres de um álcool, de ácidos gordos e do ácido fosfórico. Quando o álcool é o glicerol denominam-se fosfoglicéridos [133]. Consistem numa parte central, constituída por glicerol, a qual está conjugada com uma parte hidrófila e uma

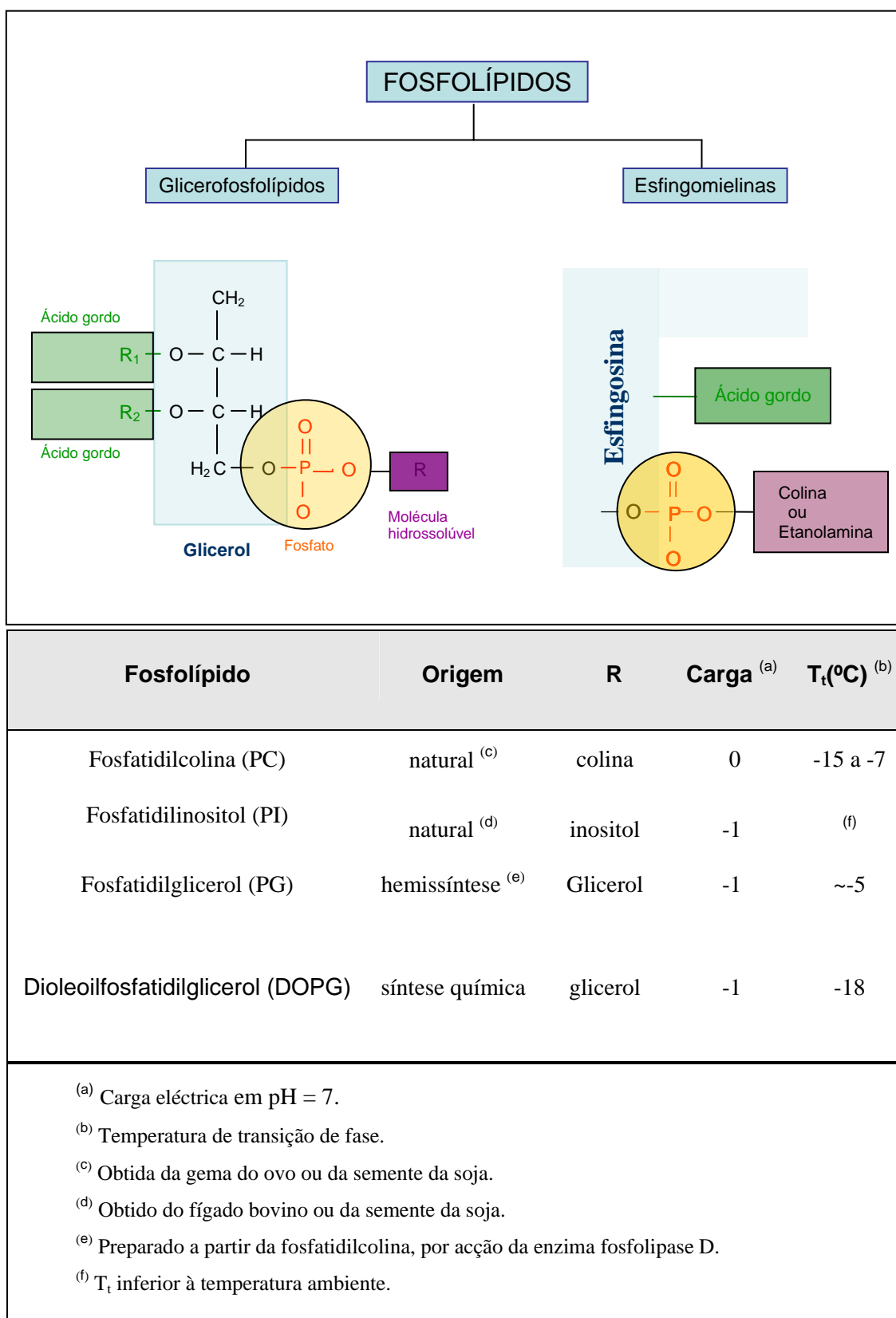
parte hidrófoba. A parte hidrófoba da molécula é constituída por 2 cadeias de ácidos gordos saturadas ou insaturadas, que esterificam 2 grupos hidroxilo do glicerol. A parte hidrófila encontra-se esterificada no terceiro grupo hidroxilo do glicerol e é composta por uma molécula de ácido fosfórico e por uma molécula hidrossolúvel, esterificadas entre si (ver **Figura I. 9.**). As moléculas hidrossolúveis contêm, pelo menos, um grupo hidroxilo, sendo as mais comuns o glicerol, a colina, o inositol, a serina ou a etanolamina (exemplos na **Figura I. 10.**). Assim, consoante os grupos ligados ao fosfato, os fosfoglicéridos poderão ter carga negativa ou serem electricamente neutros (**Figura I. 9.**) [134].

As esfingomielinas são também consideradas fosfolípidos em que o álcool é a esfingosina em vez do glicerol. O grupo amina da esfingosina está ligado a uma molécula de ácido gordo através de uma ligação amida e o grupo hidroxilo primário está esterificado na fosforilcolina ou na fosforiletanolamina [134].

Como já foi mencionado anteriormente, os fosfolípidos podem ser de origem natural ou sintética. Os de origem natural podem ser extraídos de materiais biológicos em que as cadeias acílicas correspondem a misturas de diversos ácidos gordos. Por exemplo:

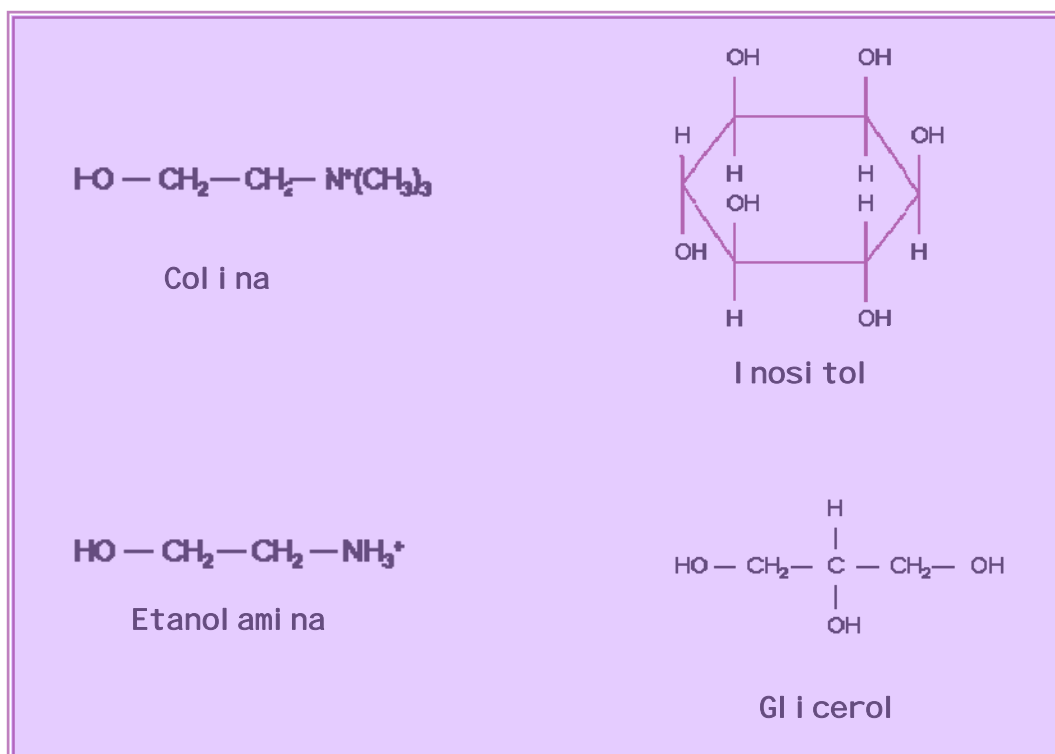
- Fosfatidilcolinas (PC) obtêm-se da soja ou da gema do ovo;
- Fosfatidilserinas (PS) obtêm-se do cérebro bovino;

Os fosfolípidos sintéticos possuem uma composição de ácidos gordos bem definida, podem ter cadeias saturadas ou insaturadas e com o número de átomos de carbono que se pretende. Um exemplo é o Dioleoilfosfatidilglicerol (*Dioleoylphosphatidylglycerol*, DOPG) que tem 2 cadeias acílicas derivadas do ácido oleico [134].



**Figura I. 9.** – Estrutura química e características físico-químicas de alguns fosfolípidos utilizados na preparação de lipossomas.  
Adaptado de Barbosa (1995) [134].





**Figura I. 10.** – Estrutura química de algumas moléculas hidrossolúveis (R).  
Adaptado de Gaspar (2004) [131].

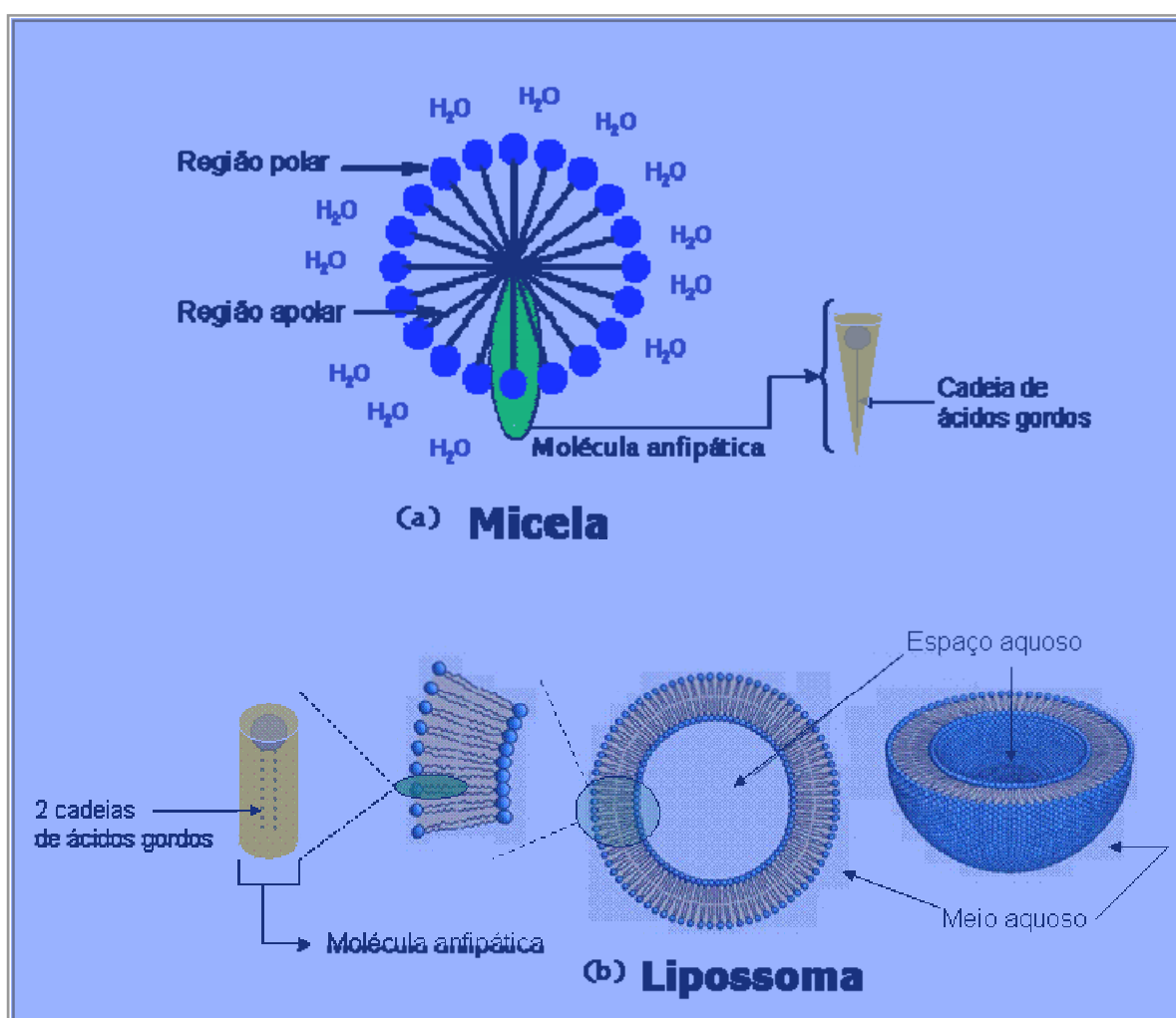
Para além dos fosfolípidos, podem também ser induzidos na mistura lipídica para formar lipossomas as seguintes moléculas:

- Colesterol – estabiliza a bicamada lipídica;
- Polietilenoglicol (Polyethyleneglycol, PEG) - aumenta o tempo de meia vida dos lipossomas na circulação sanguínea;
- Estearilamina (Stearylamine, SA) – conferem cargas positivas à superfície dos lipossomas, etc. [134-136].

### 3.4 – ORGANIZAÇÃO MOLECULAR DOS FOSFOLÍPIDOS

A organização de fosfolípidos em água pode ser variada, de acordo com o tipo de fosfolípidos e com o volume relativo ocupado pela cabeça polar e pela porção apolar. Assim quando a cabeça polar tem um maior volume que a porção apolar (fosfolípidos em forma de cone invertido), as moléculas têm tendência a organizarem-se em estruturas com um elevado raio de curvatura (micelas) (**Figura I. 11.**). Esta organização estrutural advém da interiorização das porções apolares hidrófobas que são protegidas pelas

cabeças polares hidrófilas e ocorre com moléculas anfipáticas que possuam apenas uma cadeia de ácidos gordos. Para volumes semelhantes (fosfolípidos cilíndricos), os fosfolípidos têm tendência organizarem-se em bicamadas concêntricas fechadas separadas por um ou mais compartimentos internos aquosos, formando-se lipossomas. Com efeito, os lipossomas são estruturas termodinamicamente favoráveis que se organizam de forma ordenada na presença de soluções aquosas, tendo como característica comum a exposição das porções hidrófilas para os meios aquosos (internos e externos) e as porções hidrófobas (2 cadeias de ácidos gordos) constituindo regiões apolares no interior da bicamada (**Figura I. 11.**) [118; 131; 137; 138].



**Figura I. 11.** – Representação esquemática de estruturas lipídicas em soluções aquosas:  
 (a) Micela – constituída por moléculas anfipáticas em forma de cone invertido;  
 (b) Lipossoma - constituído por moléculas anfipáticas em forma de cilindro.

### 3.5 – PROPRIEDADES FUNDAMENTAIS DOS LIPOSSOMAS

Os lipossomas como sistemas transportadores de fármacos apresentam vantagens significativas quando comparados com formulações convencionais. Destacam-se como propriedades fundamentais [135; 139-142]:

- ✓ Versatilidade do sistema por possuir na sua constituição um meio lipofílico e um meio aquoso, possibilitando a imobilização de praticamente qualquer tipo de substância, independentemente da solubilidade, carga eléctrica ou peso molecular; pela simples variação da composição lipídica, diâmetro e método de preparação;
- ✓ Possibilidade de libertação controlada do seu conteúdo para os fluidos biológicos (conceito de microreservatórios) ou para as células (através de fusão ou endocitose);
- ✓ Serem preferencialmente capturados pelo SMF, propriedade que faz deles transportadores ideais de fármacos para o fígado e o baço;
- ✓ Possibilidade de modificações na superfície dos lipossomas através da conjugação de anticorpos específicos e/ou de polímeros hidrófilos, permitindo respectivamente, um direccionamento activo para o local de acção e/ou um aumento do tempo de meia vida em circulação sanguínea;
- ✓ Redução da toxicidade do fármaco que transportam, reduzindo a exposição do fármaco a tecidos e órgãos sensíveis;
- ✓ Aumento da concentração de fármaco no alvo, diminuindo a dose terapêutica;
- ✓ Sistema biocompatível, biodegradável com baixa ou nula toxicidade e ausência de imunogenicidade;
- ✓ Possibilidade de administração *in vivo* por várias vias, nomeadamente intravenosa, pulmonar, nasal, oral, intramuscular, subcutânea e dérmica.

Contudo, algumas desvantagens podem ser evidenciadas:

- ⇓ Instabilidade. Os lipossomas tendem a agregar ou a perder o fármaco incorporado ao longo do tempo;
- ⇓ Lipoproteínas de alta densidade (HDL) e proteínas plasmáticas podem interagir com os lipossomas *in vivo*, levando a uma perda da substância incorporada;
- ⇓ A sua preparação exige uma tecnologia adequada e lípidos de elevada pureza, envolvendo custos elevados.

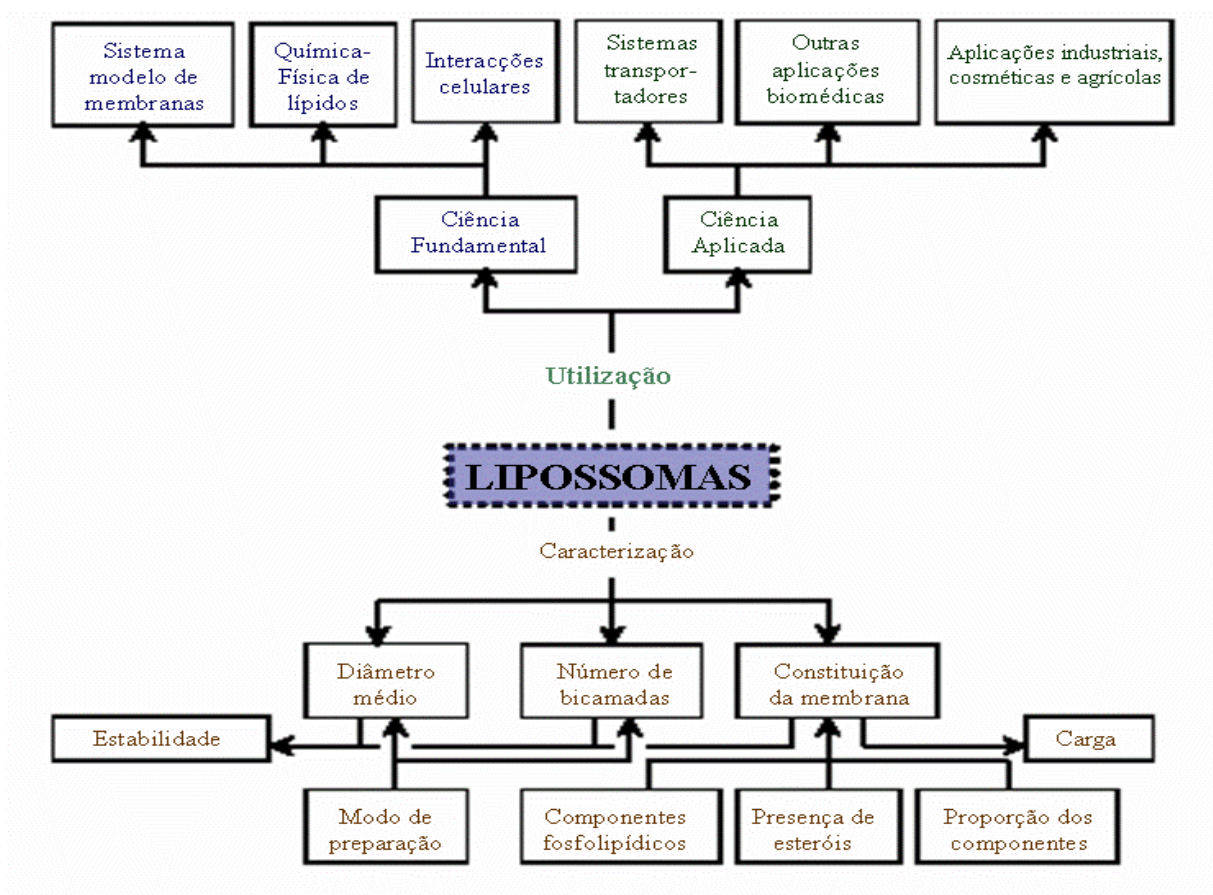
Algumas destas desvantagens têm vindo a ser superadas ao longo dos tempos, devido ao conhecimento das propriedades físico-químicas dos lipossomas, dos factores

que afectam as suas propriedades e do melhoramento das técnicas para a sua preparação.

### 3.6 – CLASSIFICAÇÃO DOS LIPOSSOMAS

Os lipossomas podem ter diversas classificações com base no seu diâmetro médio, número de bicamadas, constituição lipídica (o que também condiciona a sua carga), estabilidade e modo de preparação (Figura I. 12.) [125].

As propriedades físico-químicas dos lipossomas podem sofrer alterações que influenciam o seu comportamento *in vitro* e *in vivo*. Assim uma correcta caracterização destes sistemas lipídicos é fundamental para poder prever o seu comportamento [131].



**Figura I. 12.** – Esquema representativo das várias utilizações dos lipossomas e inter-relação entre os diversos parâmetros que os caracterizam. Adaptado de Lichtenberg e Barenholz (1988) [125].

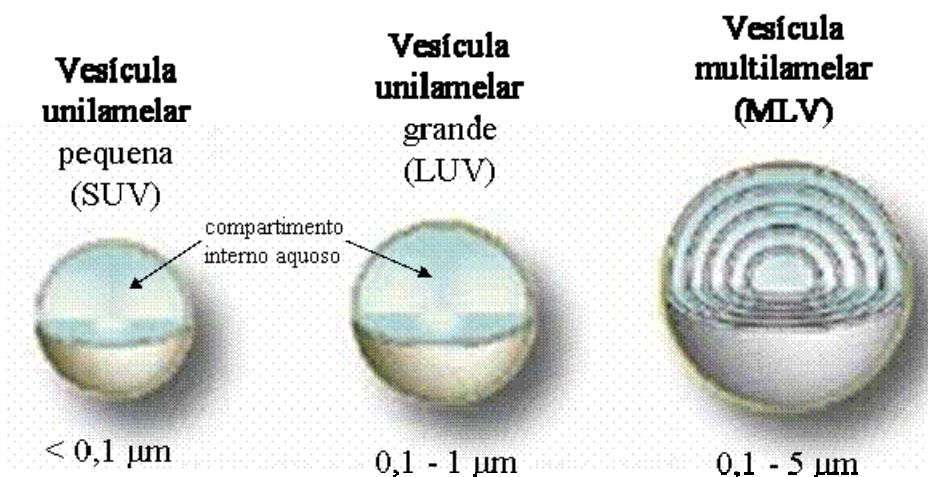
### 3.6.1 - Classificação com base no diâmetro médio e no número de bicamadas

O diâmetro das vesículas é um parâmetro fundamental no tempo de circulação dos lipossomas na corrente sanguínea. O diâmetro juntamente com o número de bicamadas, uma vez que os lipossomas podem ser constituídos por uma ou várias camadas, separando assim um ou vários espaços aquosos, influenciam a extensão da incorporação do fármaco no lipossoma [125; 143].

De acordo com o diâmetro e o número de bicamadas, os lipossomas podem ser classificados da seguinte maneira (**Figura I. 13.**):

- a) Vesículas multilamelares (*Multilamellar vesicles*, MLV's) – Têm diâmetros compreendidos entre 0,1 e 5  $\mu\text{m}$ , sendo rapidamente capturados pelo SMF. Possuem mais do que uma bicamada (cinco ou mais) e um volume interno aquoso na razão de 1 a 4 L/mol de lípido [97; 144]. Este tipo de lipossomas, é conveniente na incorporação de fármacos hidrófobos devido a serem constituídos por um grande número de porções concêntricas hidrófobas. Por outro lado, com substâncias hidrófilas observam-se baixas eficiências de incorporação (E.I.) devido a um volume interno aquoso relativamente reduzido (por mol de lípido) [145].
- b) Vesículas unilamelares grandes (*Large unilamellar vesicles*, LUV's) - Com diâmetros que variam entre 0,1 e 1  $\mu\text{m}$ , possibilitam a sua captura pelo SMF. Possuem uma bicamada única com um grande compartimento interno aquoso (razão  $\sim 7$  L/mol de lípido). Devido a estas características, este tipo de lipossomas é especialmente indicado para a incorporação de substâncias hidrófilas [144; 145].
- c) Vesículas unilamelares pequenas (*Small unilamellar vesicles*, SUV's) – Têm um diâmetro médio inferior a 0,1  $\mu\text{m}$  o que possibilita longos tempos de meia vida em circulação, podendo também atravessar rapidamente os capilares. Também possuem uma bicamada única. Apresentam uma baixa razão de volume capturado por mol de lípido (0,2 a 1,5 L/mol de lípido). Por tudo isto e devido ao seu pequeno raio de curvatura, a captura de macromoléculas é limitada, são termodinamicamente instáveis, susceptíveis de agregação e fusão quando possuem cargas superficiais baixas ou nulas [97; 98; 144].

Estes tipos de lipossomas podem ser obtidos por diversos métodos (ver 3.6.3).



**Figura I. 13.** – Tipos de lipossomas com base no seu diâmetro médio e número de bicamadas.  
Adaptado: <http://www.bytheplanet.com>.

### 3.6.2 - Classificação com base na constituição membranar e comportamento *in vivo*

Para além do diâmetro médio e número de bicamadas, o outro factor essencial para a caracterização de um lipossoma prende-se com a constituição das bicamadas lipídicas.

Como já foi referido anteriormente, os lipossomas podem também conter, para além dos fosfolípidos, outros constituintes da bicamada tais como o colesterol, lípidos conjugados com polímeros hidrófilos (ex., PEG), glicoproteínas, anticorpos ou lípidos imunogénicos, etc. Assim os lipossomas podem ser classificados de acordo com a sua composição em 4 tipos distintos (**Figura I. 14.**):

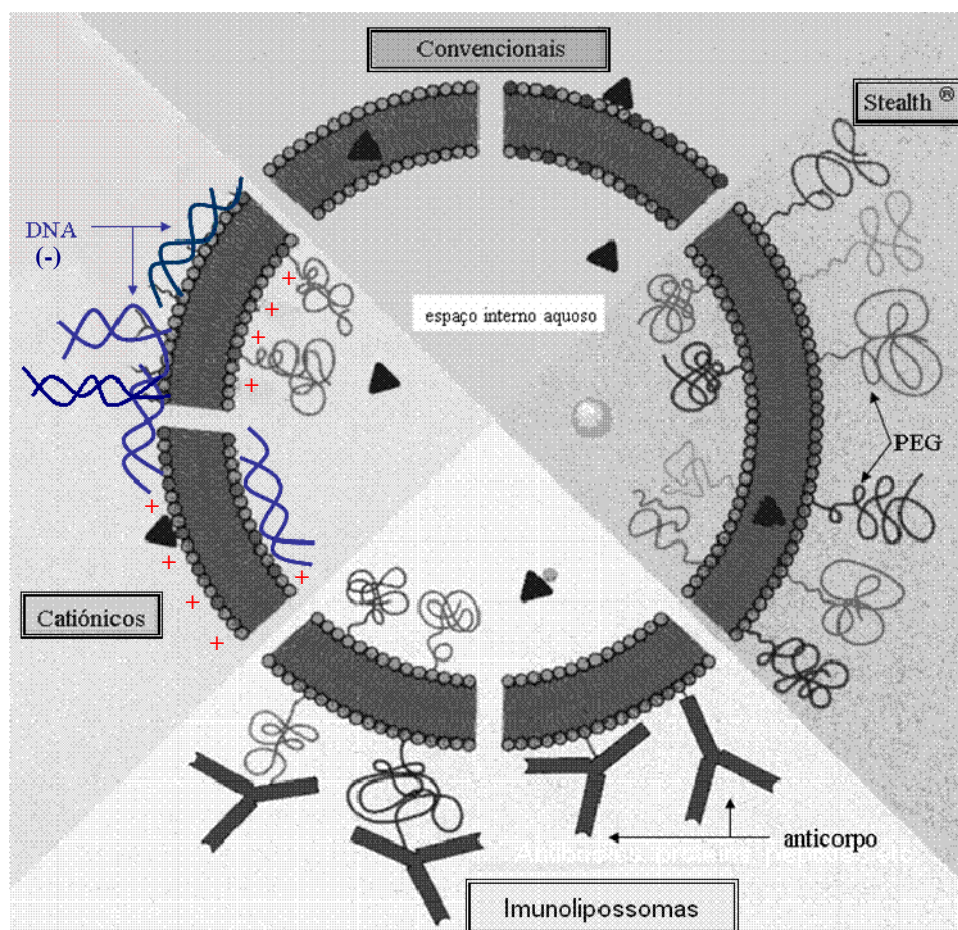
- I. Lipossomas convencionais – Estes lipossomas são constituídos por fosfolípidos com cargas neutras e/ou negativas e colesterol. Possuem pequenos tempos de meia-vida em circulação nos organismos vivos, de apenas minutos ou horas, sendo rapidamente degradados pelos componentes do sangue ou capturados pelo SMF, nomeadamente pelos macrófagos (células que têm como função a remoção de corpos estranhos) [146; 147]. Têm um direccionamento passivo para os órgãos alvo (fígado e baço) o que é extremamente útil no tratamento de infecções intracelulares desses órgãos, como na leishmaniose, tuberculose, malária e hepatite [142; 148; 149].

- II. Lipossomas Stealth<sup>®</sup> - São constituídos pelos lípidos anteriormente usados, e ainda glicolípidos, gangliósidos (ex., monoassialogangliósido, GM<sub>1</sub>) ou lípidos (ex., fosfatidiletanolamina, PE) acoplados a polímeros (ex. PEG) [150-156]. São caracterizados pela possibilidade de prolongar a sua vida média no organismo humano, durante várias horas até dias [157], através da diminuição do tropismo para o SMF, ou seja tornando-se “invisíveis” perante os macrófagos. Lipossomas contendo GM<sub>1</sub> na sua superfície imitam a camada exterior dos eritrócitos não sendo portanto reconhecidos como “corpos estranhos” para os macrófagos [158]. Quando os lipossomas contêm PEG, este polímero cobre a sua superfície externa com uma camada hidrófila que, após solvatação, impede o reconhecimento pelos componentes do sangue (opsoninas) e consequentemente pelos macrófagos evitando a sua rápida remoção [154; 155]. Além de evitarem os macrófagos, os lipossomas Stealth<sup>®</sup> mostram tendência para se acumularem em áreas não pertencentes ao SMF, nem à circulação sanguínea, estando a ser explorados como sistemas de transporte de fármacos para tumores e áreas inflamadas [159].
- III. Imunolipossomas – São lipossomas ligados a anticorpos (covalentemente ou por adsorção), reconhecendo inequivocamente o local de acção pretendido, através da identificação do antígeno específico das células ou órgãos alvo (direccionamento activo). A marcação superficial dos lipossomas com anticorpos permite libertar conteúdos extracelulares perto do tecido alvo e os fármacos podem difundir-se através da membrana plasmática de modo a produzirem os seus efeitos [97; 148; 149; 160-162].
- IV. Lipossomas catiónicos – São lipossomas constituídos por lípidos catiónicos, portanto carregados positivamente que estabelecem interacções electrostáticas com os grupos fosfatos de macromoléculas com cargas negativas (DNA, RNA e oligonucleótidos), promovendo a sua neutralização e condensação. Este tipo de lipossomas têm sido explorados como sistemas de transporte de material genético e agentes de transfecção para terapia génica [97; 147; 159; 163; 164].

Alguns destes lipossomas já se mostraram úteis na preparação de transportadores para aplicações biomédicas, nomeadamente terapia génica, quimioterapia e direccionamento de lipossomas para células, órgãos ou tecidos específicos [165].



Alguns autores ao referirem-se a estes sistemas transportadores de fármacos, fazem a distinção entre um direccionamento passivo, em que os lipossomas se direccionam no organismo de acordo com o seu padrão de distribuição natural, sendo constituídos apenas por fosfolípidos ou fosfolípidos e esteróis, e um direccionamento activo, em que se tentam modificar os padrões de distribuição natural dos lipossomas, através de alterações na sua estrutura e composição [166].



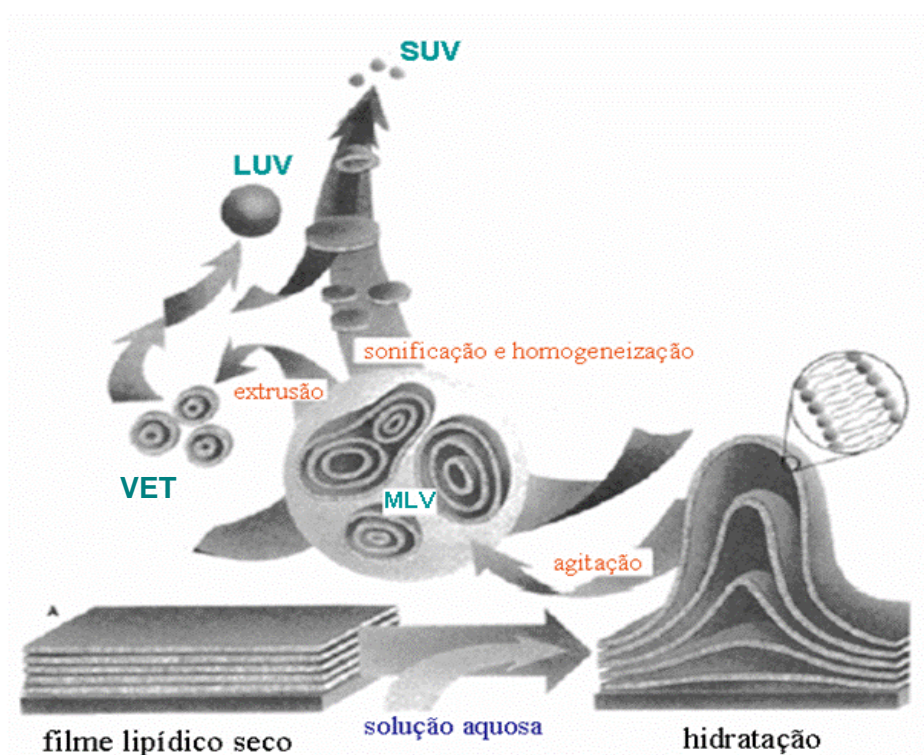
**Figura I. 14.** – Quatro diferentes classes de lipossomas com base na sua composição.  
Adaptado: <http://www.unizh.ch/onkwww/lipos.htm>.

Contudo, a composição fosfolipídica, a presença de esteróis, a proporção destes componentes e a inserção de outras moléculas na(s) bicamada(s) (Figura I. 12.), vão condicionar vários parâmetros da membrana e do próprio lipossoma; nomeadamente a sua carga, estabilidade, curvatura da(s) bicamada(s) e temperatura de transição de fase [167].



### 3.6.3 – Classificação com base no método de preparação

O tipo de lipossoma é, essencialmente condicionado pelo seu método de preparação. Assim, visto as suas propriedades físico-químicas influenciarem consideravelmente qualquer aplicação dos lipossomas, o seu método de preparação deverá ser sempre escolhido criteriosamente (**Figura I. 15.**). De um modo geral, a preparação de vesículas lipídicas pode ser dividida em três fases consecutivas: preparação das fases aquosas e lipídicas, hidratação do filme lipídico e ainda, para a maioria dos sistemas, um processamento secundário, necessário para a obtenção do produto final [142; 168; 169].

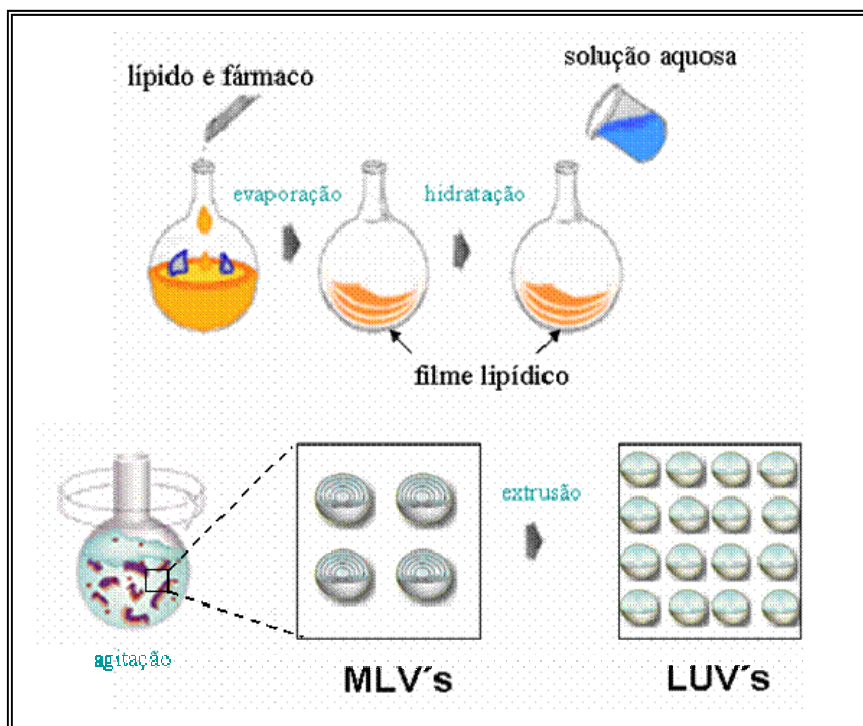


**Figura I. 15.** - Representação esquemática das metodologias de preparação de MLV's, LUV's, VET's e SUV's.  
Adaptado de Lasic (1997) [137].

Os MLV's são os lipossomas de mais fácil preparação, e por isso os primeiros a terem sido caracterizados. Foi este o sistema utilizado em todos os primeiros trabalhos [109; 110; 117], mantendo uma larga aceitação na actualidade [170; 171]. Após a escolha da composição lipídica e solução aquosa a utilizar (ex., Cloreto de sódio, tampão citmurganhos, etc.), de acordo com o objectivo pretendido, cada lípido deverá ser dissolvido num solvente ou mistura de solventes orgânicos que seja, simultaneamente,

eficiente na dissolução da concentração de lípido pretendido e suficientemente volátil (ex., clorofórmio, misturas clorofórmio-metanol). Atendendo ao volume, concentração e proporção dos componentes da suspensão de vesículas pretendida, os volumes adequados das soluções de cada componente devem ser adicionados num balão de fundo redondo. O solvente orgânico é evaporado até à secura num evaporador rotativo, de modo a formar-se um filme lipídico. De forma a eliminar qualquer vestígio de solvente, o filme deverá ser colocado sob fluxo de azoto e posteriormente, a 4°C “overnight”.

A hidratação do filme lipídico é feita adicionando ao balão contendo o filme, o volume desejado da solução aquosa escolhida. De modo a conseguir o desprendimento total do lípido das paredes do balão, esta etapa de hidratação deve-se alternar com agitação. No final da hidratação, obtém-se uma suspensão de MLV's (ver **Figura I. 16.**) [165; 169; 172].

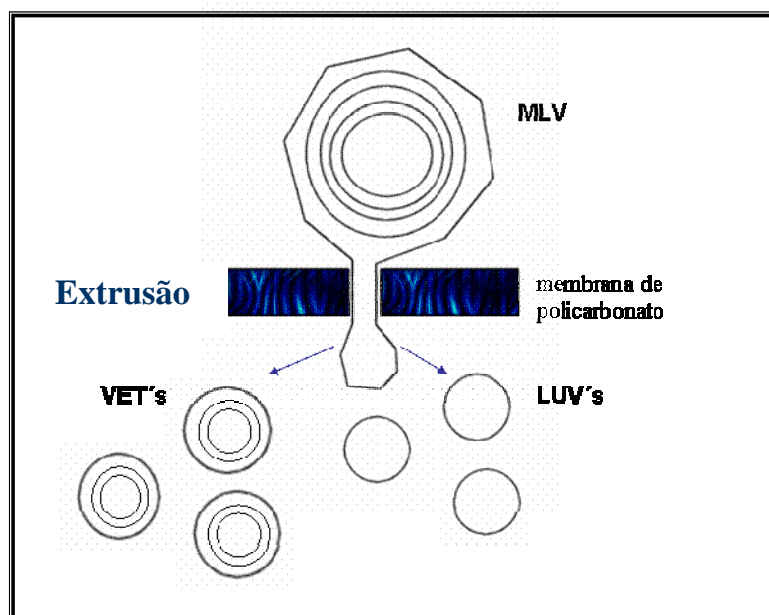


**Figura I. 16.** – Representação esquemática das etapas de preparação de MLV's e LUV's.

[1]: adição do fármaco hidrofóbico dissolvido numa solução orgânica e das fases lipídicas. [2]: secagem do filme lipídico. [3]: hidratação do filme lipídico. [4]: extrusão da suspensão de MLV's.

A obtenção de vesículas unilamelares grandes e pequenas (LUV's e SUV's) tem como base a utilização de uma suspensão de vesículas multilamelares, preparada pelo processo acima descrito. Os métodos de preparação de LUV's e SUV's diferem

essencialmente na fase final. Enquanto que, para a obtenção de SUV's, os MLV's passam por uma fase de sonificação de potência, na preparação de LUV's recorre-se a um processo de extrusão [173; 174]. A extrusão é feita sob pressão de azoto, a aproximadamente 30 bar, através de filtros de polycarbonato com poros de dimensões bem definidas. A flexibilidade das camadas lipídicas permite que estas alterem a sua conformação, verificando-se uma quebra e reestruturação após a passagem através dos poros (**Figura I. 17.**). Para concentrações elevadas de lípido são necessárias algumas extrusões prévias, utilizando filtros de poro mais largo, diminuindo-o por cada passagem, até ao pretendido. Após várias passagens, obtém-se uma amostra homogénea de lipossomas que apresentam tamanhos na ordem de grandeza dos poros da última membrana. No entanto, existe alguma discrepância na designação das vesículas obtidas por extrusão. Alguns autores referem que MLV's após extrusão não originam LUV's, mas sim, vesículas multilamelares de menores dimensões designadas por VET's ("yesicles by extrusion techniques") [135; 142; 175; 176].

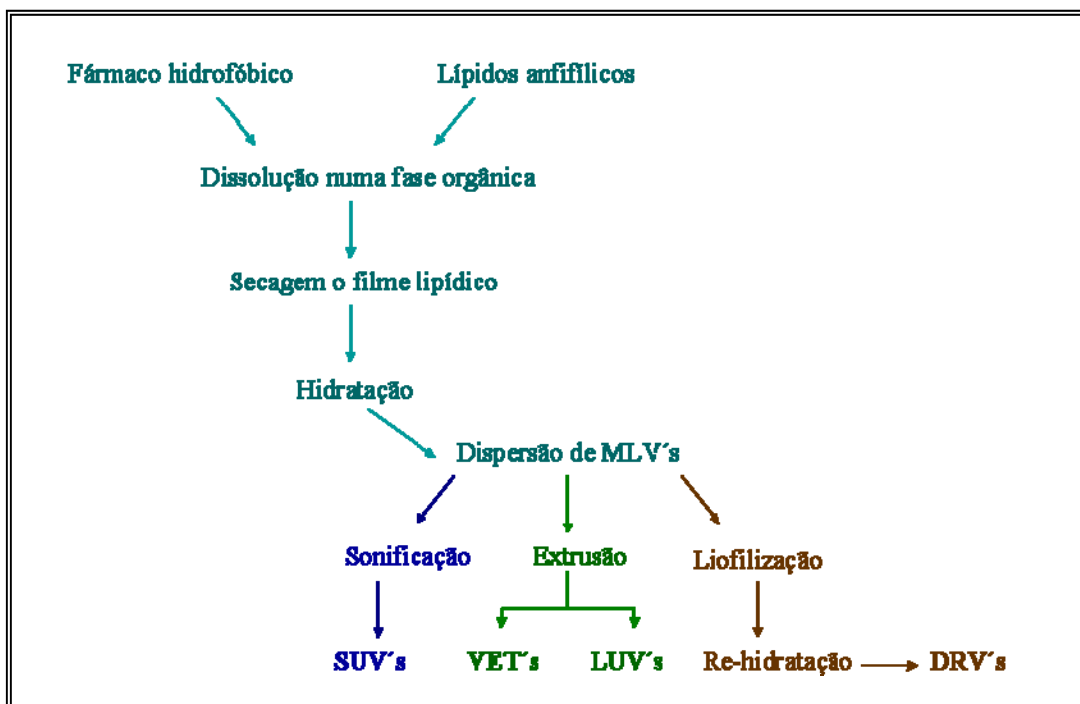


**Figura I. 17.** – Extrusão de MLV's para obtenção de VET's ou LUV's.

Kirby e Gregoriadis descreveram outro método de preparação baseado na hidratação de lipossomas após liofilização [177]. Este método inclui uma etapa de liofilização e re-hidratação que permite concentrar o fármaco junto das bicamadas lipídicas, obtendo-se eficácias de incorporação superiores [178]. As vesículas assim preparadas designam-se vesículas desidratadas e re-hidratadas, DRV's (dehydration rehydration yesicles). Para a preparação de DRV's é necessário a secagem do filme

lipídico em rotavapor, seguida de hidratação, liofilização e de uma re-hidratação controlada (**Figura I. 18.**) [126; 136; 177].

Para a incorporação de um fármaco hidrófobo (como ex., ORZ usada neste trabalho) em lipossomas, este deve ser dissolvido num pequeno volume de solvente orgânico (ex., clorofórmio) e adicionado à fase lipídica antes da etapa de evaporação (**Figura I. 16.** e **Figura I. 18.**). Após hidratação do filme lipídico, a ORZ encontra-se dispersa nas bicamadas lipídicas dos MLV's e na sua superfície.



**Figura I. 18.** – Fluxograma de alguns métodos de preparação de vesículas transportadoras de um fármaco hidrófobo.  
Adaptado de Torchilin e Weissig (2003) [172].

Existem actualmente diversos métodos de preparação de lipossomas com inúmeras variantes consoante o produto pretendido. Qualquer um dos métodos tem como finalidade incrementar a incorporação de um princípio activo nos lipossomas, homogeneizar e uniformizar as vesículas e otimizar o seu comportamento *in vivo*, com vista à aplicação terapêutica.

Aliás, sendo a finalidade última destes sistemas a comercialização, procura-se essencialmente otimizar os métodos de preparação de modo a possibilitar a obtenção de lipossomas em grande escala e sua conservação extemporânea [134].

### 3.7 – PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS LIPOSSOMAS

As propriedades físico-químicas dos lipossomas, tais como a temperatura de transição de fase ( $T_t$ ), a permeabilidade, a carga, a presença de colesterol e de polímeros, determinam as interações dos lipossomas com os constituintes sanguíneos e outros tecidos após administração.

Formulações lipossomais de vários fármacos podem ser otimizadas em termos de conteúdo de fármaco, estabilidade, padrões de biodistribuição desejáveis e captura celular, por alteração dos seus parâmetros físico-químicos [143].

#### 3.7.1 – Temperatura de transição de fase ( $T_t$ )

As bicamadas fosfolipídicas podem apresentar duas fases termodinâmicas distintas, ocorrendo a transição de uma fase para a outra por variação de temperatura. Com efeito, cada fosfolípido tem uma temperatura de transição de fase característica ( $T_t$ ), à qual as cadeias de ácidos gordos da molécula transitam de um estado de grande ordenação, com uma conformação distendida e firmemente empacotadas, para um estado de considerável mobilidade [134; 164]. Abaixo da  $T_t$  os lípidos encontram-se rígidos, com uma estrutura bem organizada (fase gel-“sólido”) e acima da  $T_t$  encontram-se numa fase cristal líquido- “fluído” (**Figura I. 19.a e b**) [97; 135]. O comprimento e o grau de insaturação das cadeias de ácidos gordos alteram a  $T_t$  dos fosfolípidos. Em geral, aumenta com o comprimento das cadeias acíclicas e diminui com o grau de insaturação [179].

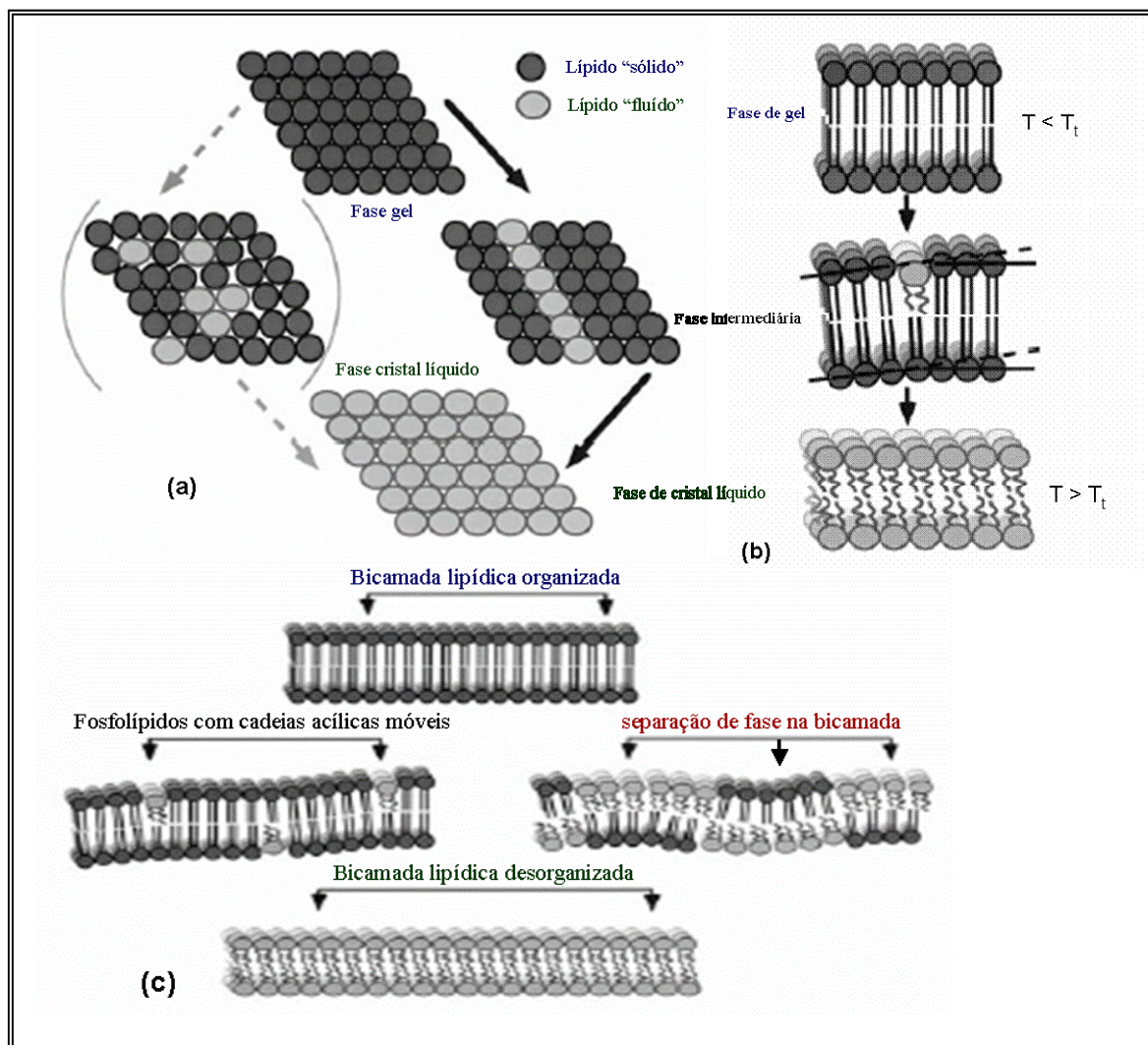
A preparação de lipossomas só é possível quando os lípidos constituintes são manipulados a uma temperatura superior às respectivas  $T_t$ . No caso de uma mistura de fosfolípidos, a temperatura de hidratação é determinada pela  $T_t$  mais elevada [134].

A permeabilidade dos lipossomas é relativamente baixa quando a temperatura se encontra abaixo da  $T_t$  do lipossoma [180; 181]. Esta propriedade faz da  $T_t$  um parâmetro a ter em conta na preparação dos lipossomas para a incorporação de fármacos. A  $T_t$  do lipossoma depende do tipo e das proporções dos diferentes componentes que o constituem. Lipossomas constituídos por uma mistura de fosfolípidos com a mesma molécula hidrossolúvel (R), mas diferindo em somente dois grupos metilo na cadeia de ácidos gordos possuem uma  $T_t$  entre a  $T_t$  individual dos dois fosfolípidos [135]. Por outro lado, uma mistura de fosfolípidos diferindo em mais de quatro grupos metilo na cadeia de ácidos gordos provoca uma separação de fase na bicamada, apresentando distintas



fases gel e cristal líquido nas diferentes áreas do lipossoma (**Figura I. 19.c**). E por conseguinte, causa inúmeros efeitos indesejáveis como a perda de estruturas em bicamada lipídica, agregação das vesículas e nalguns casos pode também catalizar a fusão de membranas [182].

A fase termodinâmica em que se encontram as bicamadas lipossômicas é extremamente importante, uma vez que influencia marcadamente a estabilidade e o comportamento das vesículas no meio biológico. Lipossomas com uma  $T_t$  elevada ( $T_t > 37^\circ\text{C}$ ) tornam a bicamada membrana menos fluida à temperatura fisiológica e menos permeável. Em contraste, lipossomas com  $T_t$  baixas ( $T_t < 37^\circ\text{C}$ ) são mais susceptíveis à saída do fármaco incorporado, a temperaturas fisiológicas [97; 135].



**Figura I. 19.** – Fases de transição apresentadas pela membrana consoante a temperatura a que se encontra. Bicamada lipídica visão de topo (a) e visão lateral (b). Diferentes tipos de bicamadas lipídicas de um lipossoma (c). Adaptado de Heimburg (2000) [183].

### 3.7.2 – Carga superficial

A carga superficial dos lipossomas é um parâmetro que pode influenciar o mecanismo e a extensão da interacção lipossoma-célula [172].

Como já foi referido anteriormente, a alteração da composição lipídica do lipossoma, incluindo fosfolípidos carregados gera um potencial electrostático de superfície devido a uma redistribuição dos protões e dos iões hidroxilos na interface bicamada-água [184]. O potencial zeta é definido como sendo a diferença entre o potencial eléctrico da superfície membranar e do meio de dispersão iónico. Este potencial fornece informações acerca da carga na superfície das vesículas e como esta pode ser afectada por mudanças no meio, nomeadamente pH ou adsorção de proteínas [131].

Lipossomas com carga superficial (potencial zeta positivo ou negativo) promovem a interacção lipossoma-célula e têm uma menor tendência em agregar devido às repulsões electrostáticas [172]. Em contrapartida, lipossomas com potencial zeta neutro, além de possuírem uma menor estabilidade física, não interagem significativamente com as células, limitando a libertação do fármaco para as mesmas [185]. Confirmando as vantagens de preparar lipossomas com carga, alguns estudos demonstraram que lipossomas catiónicos com propriedades fusogénicas distribuem os seus conteúdos às células por fusão com as membranas celulares e lipossomas com cargas negativas são predominantemente capturados pelas células por endocitose [97].

### 3.7.3 – Presença de colesterol

O colesterol é um esteróide que sendo uma molécula anfipática, orienta o seu grupo hidroxilo para a fase aquosa e tem a sua cadeia hidrófoba alinhada paralelamente às cadeias acílicas no centro da bicamada. O colesterol é um importante componente das membranas eucarióticas que por si só não forma estruturas membranares, mas pode ser incorporado em membranas fosfolipídicas em concentrações elevadas [135; 144; 181]. A presença de colesterol diminui a capacidade de movimentação das cadeias de ácidos gordos quando se encontram na fase de cristal líquido e tornam os lipossomas menos permeáveis [186]. Por outro lado, também tem sido sugerido que o colesterol pode aumentar a fluidez da bicamada lipídica abaixo da  $T_t$  (fase gel-“sólido”), destabilizando a grande ordenação das cadeias de ácidos gordos. Consequentemente, o colesterol também afecta a  $T_t$  dos lipossomas. Em geral, o aumento da concentração de colesterol

até 30 % nas bicamadas, provoca um alargamento gradual da gama de temperaturas a que ocorre a transição de fase [181; 187; 187].

### 3.8 – ESTABILIDADE DOS LIPOSSOMAS

Um dos maiores problemas que limitam a produção industrial de lipossomas é a sua estabilidade [97]. Todos os produtos farmacêuticos utilizados para aplicações *in vivo* devem ser estáveis durante pelo menos dois anos, e os lipossomas baseados no transporte de fármacos não são excepção. Além disso, produtos baseados em formulações lipossomais devem ter um tempo de armazenamento normal, mas a temperatura à qual os lipossomas devem ser estáveis deverá ser determinada pelo uso final do produto. Por exemplo, fármacos que serão usados principalmente em hospitais deverão ser estáveis quando armazenados a 4°C, enquanto que fármacos vendidos na farmácia deverão preservar a sua estabilidade à temperatura ambiente [144]. Para esse efeito, têm-se explorado outras estratégias de conservação de lipossomas (como a liofilização), e reconstituição por procedimentos rápidos e acessíveis (adição de água ou tampão) aquando da utilização. Com efeito, a liofilização de formulações lipossomais de fármacos hidrófobos em condições controladas e na presença de crioprotectores, tais como a trealose, a lactose ou a sacarose, permitiu a obtenção de resultados francamente positivos, no que diz respeito à conservação do agente incorporado, ausência de degradação química e de agregação [172; 188-190].

Com o decorrer do tempo podem ocorrer diversas modificações, químicas ou físicas, nos lipossomas [144]. Estas modificações promovem uma instabilidade nas formulações lipossomais que pode ser devida à instabilidade do lipossoma ou do agente bioactivo.

Ambos os tipos de instabilização, podem influenciar a disposição do agente bioactivo no lipossoma, o seu comportamento *in vivo* como a biodistribuição, toxicidade e actividade terapêutica, podendo portanto alterar a segurança e a eficácia da formulação [118].



### 3.8.1 – Estabilidade física

Em condições de armazenamento, os lipossomas são susceptíveis à agregação ou fusão, formando entidades maiores, e perda do agente incorporado [191]. Portanto, como já foi referido anteriormente, é importante que um produto lipossomal se mantenha estável por um período razoável. Em trabalhos de investigação, observou-se que o aumento do diâmetro médio e a perda do agente incorporado de SUV's depende da natureza da composição lipídica empregada, e do agente incorporado [192]. Algumas publicações de Szoka e Papahadjopoulos têm incidido na conservação do comportamento de várias composições lipídicas em diferentes condições de armazenamento [181]. O tipo de lipossoma também tem um papel importante na determinação da estabilidade. Dos vários tipos de lipossomas, os SUV's são os mais sensíveis a alterações do seu diâmetro médio (agregação/fusão) devido ao seu pequeno raio de curvatura que resulta numa limitação termodinâmica [144; 172; 193].

No entanto, a instabilidade física dos lipossomas pode ser minimizada tomando as seguintes precauções [172; 194]:

- Evitar composições de lipossomas que têm uma transição de fase durante a preparação e/ou as condições de armazenamento;
- Adicionar agentes quelantes (ex., EDTA ou deferoxamina) que têm como função ligar-se a iões que induzem agregação;
- Se a perda de um fármaco hidrossolúvel é um problema, seleccionar fosfolípido(s) com cadeias acíclicas saturadas e/ou colesterol na preparação dos lipossomas;
- Para fármacos hidrófobos, a perda de fármaco incorporado pode ser minimizada pelo aumento de afinidade com a bicamada através de interacção electrostática ou derivatização do fármaco;
- Estabilizar os lipossomas contra a agregação ou fusão, por adição de uma pequena fracção de moléculas carregadas (ex., 10% de PG), ou de polímeros hidrófilos (ex., PEG) que se acoplam à bicamada;
- Evitar a liofilização das vesículas lipossomais na ausência de crioprotectores;
- Armazenar os lipossomas a baixas temperaturas ou numa forma liofilizada estável;

### 3.8.2 – Estabilidade química

A estabilidade do produto lipossomal é afectada pela estabilidade química do fármaco incorporado, e do lípido utilizado na preparação dos lipossomas.

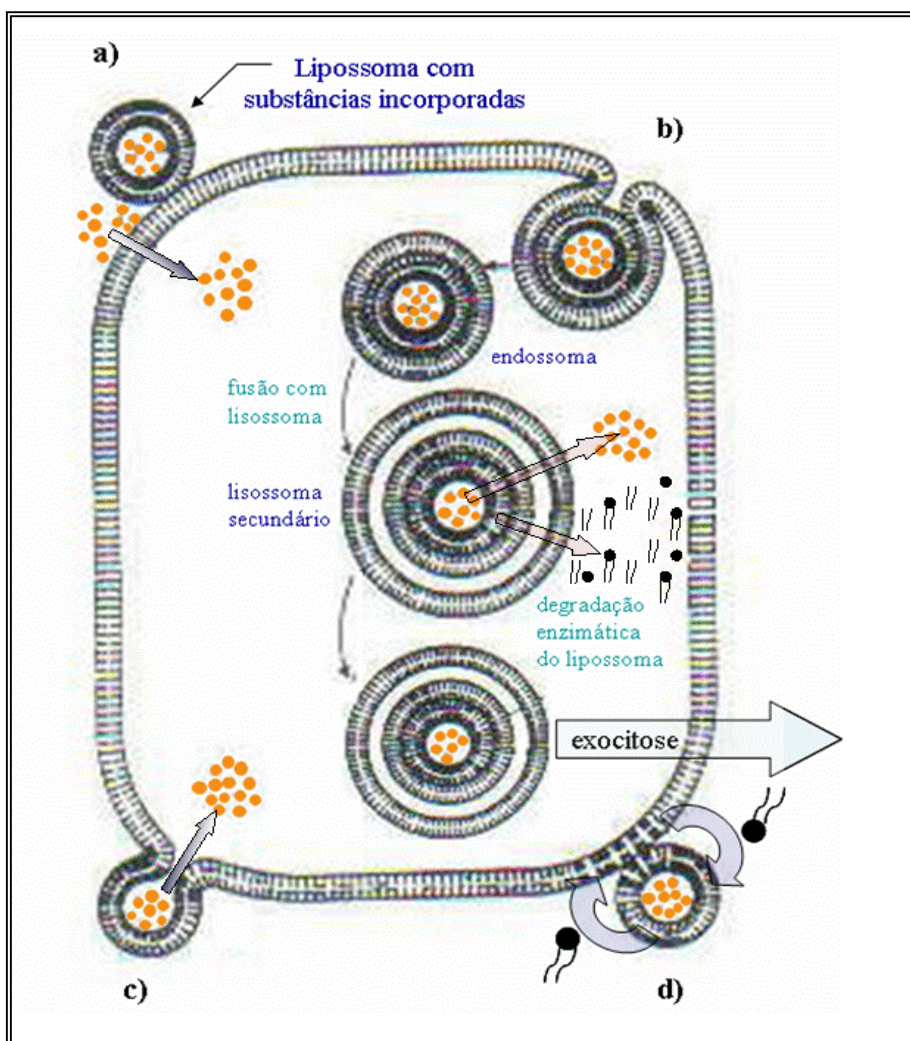
A instabilidade química pode ser devida à peroxidação dos constituintes dos lipossomas (lípidos e esteróis), ou a reacções de hidrólise dos fosfolípidos [125]. A oxidação fosfolipídica pode ser retardada pela inclusão de anti-oxidantes, como o  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) ou o butil-hidroxitolueno, nos componentes da membrana lipídica [194-196]. Uma abordagem alternativa para os problemas de oxidação seria reduzir os níveis de lípidos oxidáveis na membrana, usando fosfolípidos que contenham cadeias de ácidos gordos saturados, e pela preparação e conservação das dispersões lipossómicas em condições apropriadas, como, por exemplo, sob pressões de oxigénio reduzidas, obtidas por injeção de árgon ou azoto, ou por um método de preparação de um filme lipídico biosensor desenvolvido por Nikolelis e Mitrokotsa [135; 144; 194; 197; 198].

Ambos os fosfolípidos, saturados e insaturados, são susceptíveis de hidrólise numa fase aquosa e levam à formação de lisofosfolípidos e ácidos gordos. A taxa de hidrólise é dependente do pH do meio [199]. A um pH próximo do neutro, a hidrólise das ligações ésteres dos fosfolípidos é lenta. No entanto, mesmo a pH ácidos, a hidrólise pode ser reduzida se houver uma completa remoção do solvente residual dos filmes lipídicos secos [135; 144]. Um método para evitar a hidrólise é o uso de lípidos que contenham ligações éteres em vez de ligações ésteres, como as existentes nas membranas de bactérias halofílicas [200]. Comparativamente, a hidrólise *in vivo* resulta de um ataque enzimático que pode ser impedido pelo uso de esfingomielinas ou de derivados de fosfolípidos com as suas ligações 2-éster substituídas por funções carbamoiloxi [201; 202].

O factor de estabilidade ganhou uma grande importância na última década, devido ao vasto desenvolvimento de formulações lipossomais com potencialidade como agentes terapêuticos, tornando-se necessário garantir a sua estabilidade em armazenamento, do ponto de vista químico e físico [118].

### 3.9 – INTERACÇÃO LIPOSSOMA-CÉLULA

Uma vez que o local de acção da maioria dos produtos lipossomais com aplicações farmacêuticas é a célula, torna-se importante conhecer os mecanismos pelos quais interagem com as células e lhes cedem o seu conteúdo. Na **Figura I. 20.** apresenta-se esquematicamente os mecanismos básicos de interacção lipossoma-célula. A ocorrência destas interacções depende em grande parte das características dos lipossomas, tais como a composição lipídica, o diâmetro médio, a carga superficial, e a presença de constituintes que integram a bicamada lipídica, permitindo um direccionamento activo dos lipossomas, bem como das características celulares e ambientais (presença de sangue ou soro) [137; 172; 203; 204]. Deste modo, as interacções podem ser classificadas como se descreve em seguida.



**Figura I. 20.** – Representação esquemática dos 4 tipos de mecanismos de interacção lipossoma – célula: a) adsorção; b) fagocitose/endocitose; c) fusão; d) transferência intermembranar.

### 3.9.1 – Transferência intermembranar

A transferência intermembranar de componentes lipídicos pode ocorrer quando acontece um contacto íntimo entre os lipossomas e as membranas biológicas. Esta transferência lipídica pode não levar à ruptura do lipossoma, nem prejudicar a integridade da bicamada lipossómica (**Figura I. 20.a**). De facto é possível algumas transferências ocorrerem reversivelmente (nas duas direcções) com uma completa retenção dos conteúdos do compartimento aquoso do lipossoma [135]. Uma proteína específica, presente na superfície celular, deverá exercer uma função importante no processo, uma vez que a transferência se restringe somente a certos fosfolípidos (fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina) e é reduzida após o tratamento das células com tripsina [205]. Este processo ocorre preferencialmente com lipossomas na fase de cristal líquido e com fosfolípidos com pequenas cadeias de ácidos gordos [137].

### 3.9.2 – Adsorção

A adsorção dos lipossomas à superfície celular pode dever-se a forças físicas de atracção ou ao estabelecimento de interacções entre ligandos presentes na membrana das vesículas e receptores celulares específicos [135]. Após o lipossoma ser adsorvido, parte do conteúdo lipossómico penetra na célula por difusão (**Figura I. 20.b**) [137]. Surpreendentemente, a captura é mais provável a temperaturas inferiores à  $T_l$  da membrana dos lipossomas (na fase de gel), presumivelmente porque os locais envolvidos na ligação são imperfeições da membrana que permanecem mais estáveis a baixas temperaturas. A adsorção poderá constituir o primeiro passo para a ingestão do lipossoma pelas células, mas os factores que determinam se o lipossoma é ou não ingerido por pinocitose ou fagocitose, ainda não são completamente compreendidos [135].

### 3.9.3 – Fusão

A fusão dos lipossomas com as células envolve uma completa “mistura” da membrana lipossomal com a celular, dando-se a libertação dos conteúdos lipossómicos no citoplasma da célula (**Figura I. 20.c**) [135; 172]. Actualmente, já foi demonstrado que este processo não ocorre espontaneamente, só se verificando no caso das vesículas serem constituídas por lípidos fusogénicos (ex., dioleoilfosfatidiletanolamina, (DOPE)) ou apresentarem agentes específicos que induzem a fusão, proteínas ou peptídeos de fusão, análogos a vírus [163; 172; 206-209]. Contudo, devido à transfecção celular de DNA ou oligonucleótidos antisense *in vivo* ser extremamente desejada, vários trabalhos têm sido realizados usando lipossomas com propriedades fusogénicas. Estas propriedades além de serem conferidas por constituintes lipídicos, também podem ser conferidas pela inserção de proteínas específicas de vírus, na bicamada lipídica de lipossomas de composição mais convencional. Nesta circunstância, os lipossomas passam a designar-se por virossomas [210; 211]. Estes tipos de lipossomas apresentam-se como um sistema promissor para a terapia génica, uma vez que, no processo de fusão os genes são transferidos directamente para o citoplasma, não sendo susceptíveis de serem inactivados por enzimas lisossómicas (processo endocítico) [164; 212; 213].

### 3.9.4 – Fagocitose/endocitose

Este é o principal mecanismo de interacção com as células e ocorre quando células com actividade fagocítica capturam os lipossomas por invaginação da membrana citoplasmática em compartimentos endossomais [135; 137; 144; 172]. Estes endossomas fundem-se com lisossomas, resultando na digestão lisossómica dos lipossomas e subsequente libertação dos conteúdos lipossomais no citoplasma (ver **Figura I. 20.d**) [172]. Durante o processo de rompimento dos lipossomas, as enzimas lisossómicas hidrolisam os fosfolípidos a ácidos gordos, que podem ser reciclados e reincorporados em fosfolípidos do próprio organismo. Alternativamente, após a digestão dos lipossomas, os conteúdos libertados do compartimento aquoso podem ficar apreendidos nos lisossomas até ocorrer a exocitose. Em adição ao fenómeno de fagocitose, os lipossomas podem também ser capturados por endocitose mediada por receptores à superfície da célula [135; 172]. Os lipossomas constituídos por bicamadas bem organizadas e com elevada rigidez (fase gel-“sólido”), ou contendo colesterol, são muito mais resistentes à digestão intralissossómica do que as do tipo fluido [135].

## **II. - OBJETIVOS**



## 1 – OBJECTIVO GERAL

Esta dissertação tem por objectivo desenvolver formulações lipossomais de uma molécula bioactiva, com vista a permitir um direccionamento para os órgãos alvo da doença (leishmaniose) e assim aumentar o seu índice terapêutico *in vivo*.

## 2 – OBJECTIVOS ESPECÍFICOS

- i. Avaliar os parâmetros de incorporação de um fármaco seleccionado, orizalina, em lipossomas, para o que serão realizados os seguintes estudos:
  - Determinação do tipo de composições lipídicas que favorecem a incorporação de orizalina em lipossomas;
  - Efeito da variação da razão molar dos lípidos utilizados na preparação dos lipossomas;
  - Determinação da concentração de orizalina para a qual as vesículas lipossomais se encontram saturadas;
- ii. Caracterizar sob o ponto de vista físico-químico as formulações lipossomais;
- iii. Desenvolver e caracterizar um método de preparação de lipossomas que maximize concomitantemente os rendimentos de orizalina e lípido, as razões fármaco/lípido e a eficácia de incorporação;
- iv. Seleccionar uma formulação lipossomal de orizalina com os melhores parâmetros de incorporação;
- v. Estudar a estabilidade *in vitro* da formulação lipossomal de orizalina seleccionada;
- vi. Determinar a actividade terapêutica da orizalina na forma lipossomal e na forma livre em murganhos BALB/c infectados com leishmaniose;



### **III. – PARTE EXPERIMENTAL**



## 1 – ESQUEMA DO TRABALHO REALIZADO

O trabalho desenvolvido pode ser dividido em três partes:

- I. Desenvolvimento e optimização de métodos apropriados para a incorporação de orizalina em lipossomas. Tal será feito através da incorporação do fármaco em diferentes tipos de lipossomas, fazendo variar diversos parâmetros, como a composição lipídica (nomeadamente pela inclusão de colesterol), o método de preparação e a utilização de crioprotectores.

Será feita a caracterização das formulações sob o ponto de vista físico-químico, nomeadamente em termos do diâmetro médio das vesículas, da composição lipídica, das razões fármaco/lípido iniciais e finais, da concentração intra-lipossomal de fármaco, da eficácia de incorporação e do potencial zeta. Esta caracterização será feita, utilizando os seguintes métodos:

- Método de Rouser para o doseamento de fosfolípidos.
- Método espectrofotométrico para o doseamento de orizalina.

- II. Selecção das formulações mais apropriadas para realização de testes de estabilidade e para futura utilização *in vivo*.

Nesta fase da tese serão realizados estudos de estabilidade, com as formulações desenvolvidas, a 4 °C (condição de armazenamento) e a 37 °C em albumina sérica bovina (BSA) (simulação do comportamento dos lipossomas *in vivo*).

- III. Realização de testes de actividade biológica com uma formulação lipossomal seleccionada nas fases anteriores. Esta fase inclui o estabelecimento e verificação de um modelo animal de leishmaniose visceral, através de um inoculo da estirpe de *Leishmania infantum* MON-1 (MCAN/PT/94/IMT 205) para avaliação da actividade terapêutica da orizalina.

## 2 – MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 – LÍPIDOS E REAGENTES

A orizalina utilizada no trabalho foi adquirida à Supelco, E.U.A. Os fosfolípidos, fosfatidilcolina (PC), fosfatidilglicerol (PG), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), foram adquiridos à Avanti Polar Lipids, Inc. (E.U.A).

O colesterol (Chol), a estearilamina (SA) e a albumina sérica bovina (BSA) foram adquiridos à Sigma - Aldrich Chemie (Alemanha) (**Figura III. 1.**).

Todos os restantes reagentes e solventes utilizados são de grau analítico.



**Figura III. 1.** - Lípidos comerciais utilizados na preparação de lipossomas.

### 2.2 – MÉTODOS DE DOSEAMENTO E PARÂMETROS UTILIZADOS PARA A CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES

De forma a caracterizar as formulações lipossomais foram efectuados doseamentos de fármaco, ou seja de orizalina (ORZ) e de lípido e, foram, também, determinados a carga superficial e o diâmetro das vesículas que serão descritos posteriormente. Com os resultados obtidos, foram calculados vários parâmetros que irão servir para caracterizar estes sistemas do ponto de vista físico-químico.

Os parâmetros utilizados para caracterizar as formulações lipossomais foram: razão fármaco/lípido inicial  $[ORZ/Lip]_{(i)}$  (g/mol), razão fármaco/lípido final  $[ORZ/Lip]_{(f)}$  (g/mol), rendimento em fármaco  $(ORZ_{(f)}/ORZ_{(i)})$  (%), rendimento em lípido  $(Lip_{(f)}/Lip_{(i)})$

(%) e eficácia de incorporação (E.I.) (%) definida como a razão entre a  $[ORZ/Lip]_{(f)}$  e a  $[ORZ/Lip]_{(i)}$  (**Equação III.1.**) [176; 214; 215].

$$E.I = \frac{[ORZ / Lip]_{(f)}}{[ORZ / Lip]_{(i)}} \times 100 \quad \text{(Equação III.1.)}$$

ORZ<sub>(i)</sub> – orizalina inicial; ORZ<sub>(f)</sub> – orizalina retida nos lipossomas;

Lip<sub>(i)</sub> – lípido inicial; Lip<sub>(f)</sub> – lípido após centrifugação organizado em lipossomas

Este parâmetro é a medida da eficiência do sistema inicial, (fármaco/lípido)<sub>(i)</sub>, para incorporar o fármaco na forma lipossomal final (fármaco/lípido)<sub>(f)</sub>.

### 2.2.1 – Doseamento de Orizalina por um método espectrofotométrico.

O método utilizado para o doseamento de ORZ foi a espectrofotometria directa utilizando para tal um Espectrofotómetro Shimadzu UV-160A (Shimadzu, Japão) com posicionador/termostatizador incorporado (modelo CPS-240A, Shimadzu, Japão) (**Figura III. 2.**).



**Figura III. 2.** - Espectrofotómetro Shimadzu UV-160A com posicionador/termostatizador incorporado modelo CPS-240A (Japão).

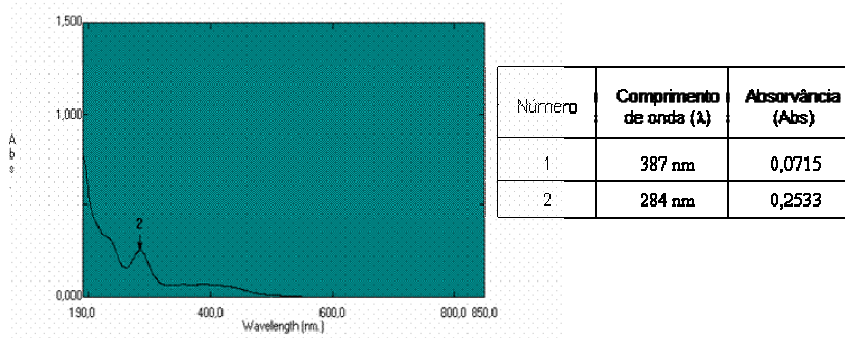
Este método tem como base a absorção específica da ORZ a 284 nm (**Figura III. 3.**). A absorvância é determinada após ruptura dos lipossomas em acetonitrilo e água. A

quantificação de ORZ é realizada por interpolação numa curva de calibração da ORZ em acetonitrilo e água.

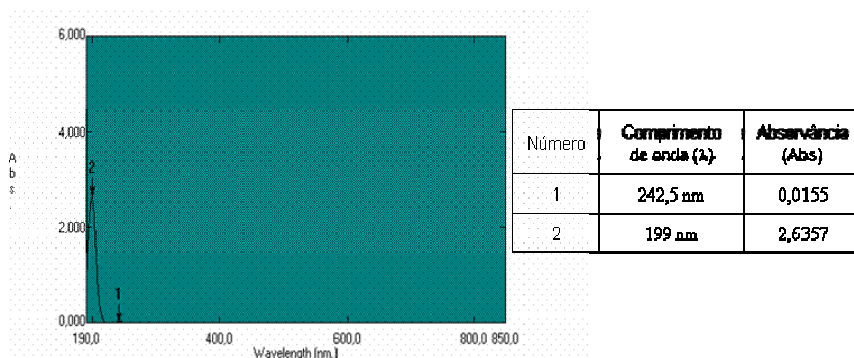
## Protocolo experimental

Numa primeira fase foram realizados vários espectros de ORZ dissolvida em solventes (acetonitrilo e água) de modo a obter-se um comprimento de onda ao qual a orizalina a teria um pico de absorção máximo (**Figura III. 3.** a **Figura III. 5.**). A descrição pormenorizada da montagem da técnica está no ANEXO I.

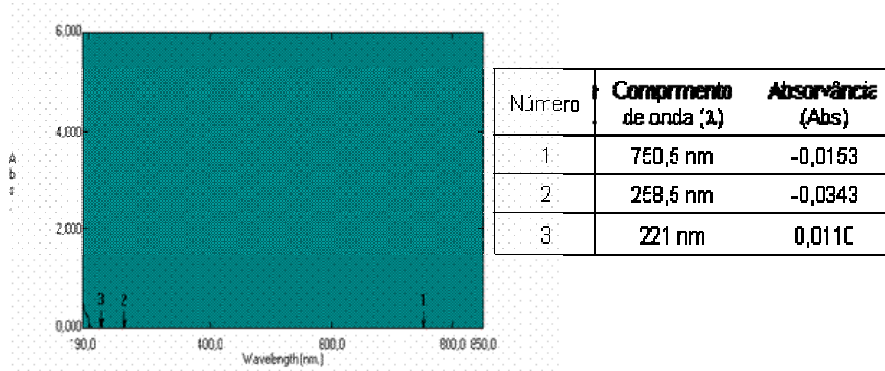
Observou-se que os lípidos (PC e PG) têm um pico de absorção máximos ao comprimento de onda de 199 nm e que a absorção dos solventes utilizados é nula, confirmando que ao comprimento de onda de 284 nm apenas o fármaco é absorvido.



**Figura III. 3.** - Espectro de absorção de orizalina com uma concentração de 5 µg/mL, (concentração teórica de ORZ, após diluição de 1/60) obtido por varrimento de comprimento de onda entre 190 e 850nm.



**Figura III. 4.** - Espectro de absorção de lipossomas vazios de composição lipídica PC:PG (4:1), com uma concentração de 0,17 µmol/mL (concentração dos lipossomas após diluição de 1/60), obtido por varrimento de comprimento de onda entre 190 e 850 nm.



**Figura III. 5.** - Espectro de absorção de uma solução de 20 % (v/v) de acetonitrilo e 80 % (v/v) de água, obtido por varrimento de comprimento de onda entre 190 e 850 nm.

Preparou-se uma solução stock de ORZ a 50 µg/mL em acetonitrilo (100 %) adquirido à Riedel-de Haen (Alemanha). De seguida, procedeu-se a uma diluição de modo a obter uma solução com a razão pretendida (20 por cento de acetonitrilo e 80 por cento de água desmineralizada) (**Equação III.2.**)

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

$$C_f = [P_{\text{máx}}] = \frac{(50 \mu\text{g} / \text{mL}) \times (4 \text{ mL})}{(20 \text{ mL})} \quad (\text{Equação III.2.})$$

$$[P_{\text{máx}}] = 10 \mu\text{g} / \text{mL}$$

$C_i$  – Concentração inicial

$V_i$  – Volume inicial

$C_f$  – Concentração final

$V_f$  – Volume final

Para efectuar a curva de calibração foram preparados 5 mL de soluções de ORZ a 8; 6; 5; 4 e 2 µg/mL a partir da solução de 10 µg/mL (Padrão máximo –  $P_{\text{máx}}$ ), perfazendo-se cada uma destas soluções com uma solução de acetonitrilo e água desmineralizada (Ac/H<sub>2</sub>O) na mesma razão do padrão máximo (20% acetonitrilo + 80% água desmineralizada) (**Tabela III. 1.**)

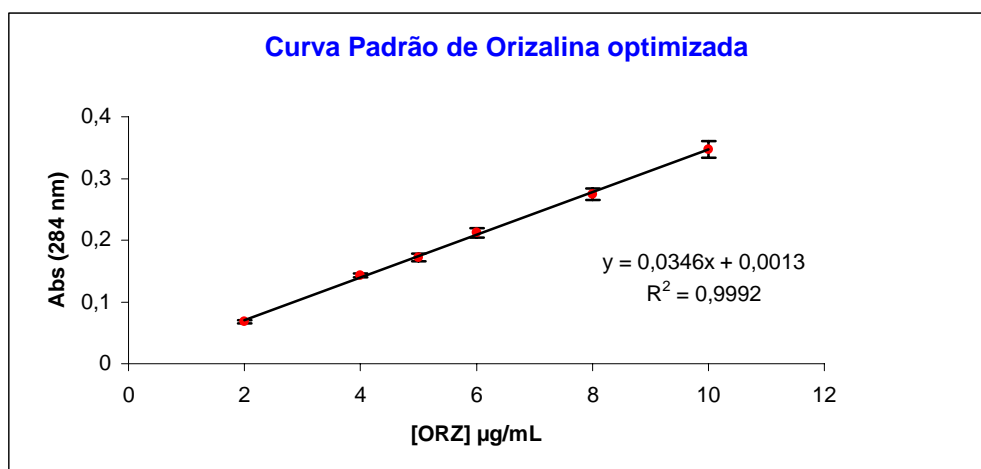
Preparou-se também uma formulação de lipossomas vazios de PC:PG 4:1, com uma concentração de lípido total de 10 µmol/mL, para ser adicionada a todos os pontos da curva de calibração de forma a simular a presença de lipossomas nas amostras reais .

**Tabela III. 1.** - Preparação da curva de calibração para o doseamento de ORZ por espectrofotometria directa.

Padrões	ORZ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Volume inicial (mL)	Solução Ac/H <sub>2</sub> O
P <sub>1</sub>	10	-	-
P <sub>2</sub>	8	4	1
P <sub>3</sub>	6	3	2
P <sub>4</sub>	5	2,5	2,5
P <sub>5</sub>	4	2	3
P <sub>6</sub>	2	1	4

Nota: De modo a otimizar a curva padrão de orizalina foram efectuados triplicados para cada ponto da curva.

Foi então efectuada a leitura da absorvância a 284 nm e registados os valores obtidos para cada Padrão, obtendo-se a recta de calibração (**Figura III. 6.**)



**Figura III. 6.** - Curva de calibração obtida pela leitura de absorvância a 284 nm de várias soluções de ORZ dissolvidas em 20 por cento de acetonitrilo e 80 por cento de água. Os resultados apresentados representam a média e o desvio padrão de 3 experiências independentes.

A preparação das amostras irá depender da concentração de ORZ inicial utilizada na preparação dos lipossomas. Assim, as amostras a serem lidas no espectrofotómetro



foram preparadas por diluição de 20 µL de lipossomas com ORZ em acetonitrilo e água desmineralizada, mantendo a razão acetonitrilo:água de 20:80. Exemplo:

- Amostras preparadas partindo de uma concentração de ORZ(i) de 1 µmol/mL:

(1/60)

**20 µL de Am + 240 µL de Acetonitrilo + 940 µL de H<sub>2</sub>Od**

- Amostras preparadas partindo de uma concentração de ORZ(i) de 2 µmol/mL:

(1/90)

**20 µL de Am + 360 µL de Acetonitrilo + 1 420 µL de H<sub>2</sub>Od**

Am – Amostra

H<sub>2</sub>Od – Água desmineralizada

ORZ(i) – Orizalina inicial

A concentração final das amostras foi obtida pela leitura de triplicados de cada amostra, nas condições referidas acima, por interpolação do valor da mediana na curva de calibração de ORZ.

### 2.2.2 – Doseamento de fosfolípidos pelo método de Rouser

Para quantificar os fosfolípidos que constituem os lipossomas, utilizou-se o método de Rouser [216]. Este método baseia-se na determinação colorimétrica do fosfato inorgânico. Os componentes fosfolipídicos dos lipossomas podem ser determinados após hidrólise dos fosfolípidos com ácido perclórico em fosfatos inorgânicos. O fosfato inorgânico em presença do molibdato de amónio é convertido a ácido fosfomolibdico que é reduzido pela adição de ácido ascórbico, formando um complexo azul após aquecimento. A reacção tem a duração de 5 minutos quando feita num banho termostatzado a 100 °C. O composto corado pode ser determinado por leitura de absorvância no visível, a 797 nm.

## Protocolo experimental

Nesta técnica é usual a preparação prévia da solução padrão de fosfato ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) 0,5 mM e da solução de molibdato de amónio a 1,25% que podem ser guardadas a 4 °C para futuras utilizações. Por outro lado, a solução de ácido ascórbico a 5%, deverá ser preparada em cada doseamento para não haver risco de oxidação pela luz. Para cada doseamento é efectuada uma curva de calibração (ver **Tabela III. 2.**). Para tal colocam-se em tubos devidamente identificados, os volumes de solução padrão ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,5mM) necessários de modo a obter as seguintes quantidades de fosfato inorgânico: 0,02; 0,03; 0,04; 0,05; 0,06 e 0,08  $\mu\text{mol}$ . Acrescentam-se também dois tubos referentes ao branco. Tanto os padrões como o branco irão sofrer o mesmo tratamento a que são sujeitas as amostras e que irá ser descrito posteriormente. Normalmente é necessário efectuar uma diluição prévia das amostras (1:10), para as leituras se encontrarem dentro da curva padrão.

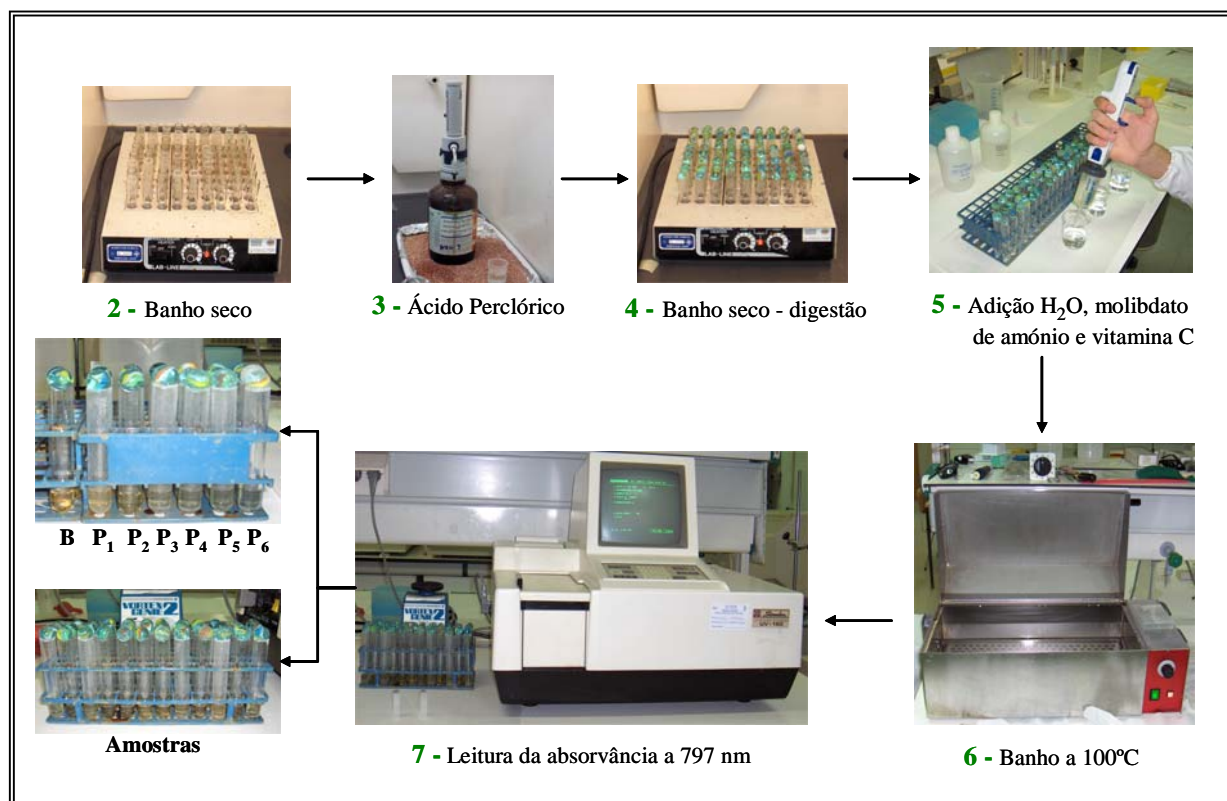
Após realizada a diluição são colocados 50  $\mu\text{L}$  de cada amostra, em triplicado, em tubos também devidamente identificados. Todos os tubos são aquecidos na unidade de aquecimento de tubos (Lab-Line Multi-Block, E.U.A.) até à secura total. De seguida, retiram-se os tubos do aquecimento, deixam-se arrefecer completamente e adicionam-se 300  $\mu\text{L}$  de ácido perclórico 70% (Merck, Alemanha). De seguida, submetem-se os tubos a aquecimento a 170°C durante cerca de 45 minutos ou até se verificar o desaparecimento da coloração. Como já foi referido, é neste passo que ocorre a hidrólise dos fosfolípidos e libertação do fosfato que irá ser doseado.

Removem-se os tubos da unidade de aquecimento e deixam-se arrefecer completamente à temperatura ambiente, adicionando-se seguidamente 1 ml de água, 400 $\mu\text{L}$  de molibdato de amónio (Riedel de Haen, Alemanha) a 1,25%, 400  $\mu\text{L}$  de ácido ascórbico (Riedel de Haen, Alemanha) a 5% e promove-se a homogeneização da mistura. Colocam-se os tubos no banho termostatzado a 100°C (Salvis WKV25, Rotkreuz, Suíça) durante 5 minutos para se dar a reacção. Após arrefecimento total dos tubos é efectuada a leitura da absorvância a 797nm (Espectrofotómetro Shimadzu UV-160, Japão). Esta leitura deverá ser efectuada contra o “branco” (**Figura III. 7.**).

**Tabela III. 2.** - Etapas para a quantificação espectrofotométrica de fosfolípidos constituintes dos lipossomas.

Etapas	Identificação	Branco (n= 2)	Padrões (n = 3)						Amostras (n = 3)		
		nB	nP <sub>1</sub>	nP <sub>2</sub>	nP <sub>3</sub>	nP <sub>4</sub>	nP <sub>5</sub>	nP <sub>6</sub>	nA <sub>i</sub>	nA <sub>ext</sub>	nA <sub>F</sub>
1)	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,5 mM (μL)	-	40	60	80	100	120	160	-	-	-
	Amostras diluídas (1:10) (μL)	-	-	-	-	-	-	-	50	50	50
2)	Lab-Line Multi-Block	Banho seco (evaporar até à secura)									
3)	Ácido perclórico 70% (μL)	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
4)	Lab-Line Multi-Block + Berlindes	Banho seco – digestão (aquecer a 170°C durante 45 min.)									
5)	H <sub>2</sub> O (μL)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
	Molibdato de amónio 1,25%(μL)	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400
	Ácido ascórbico 5% (μL)	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400
6)	Banho a 100°C durante 5 min.										
7)	Abs. 797 nm										

A<sub>i</sub> – Amostra inicial; A<sub>ext</sub> – Amostra extrusada; A<sub>F</sub> – Amostra final.



**Figura III. 7.** - Representação esquemática das etapas de doseamento de fosfolípidos pelo método de Rouser.

### 2.2.3 – Determinação do diâmetro médio dos lipossomas

Os métodos para a determinação do diâmetro médio dos lipossomas para além de variarem na complexidade e no grau de sofisticação, exigem equipamentos de elevado custo. Estes métodos fornecem uma informação precisa acerca do perfil de uma população lipossomal, permitindo analisar as variações de tamanhos dos lipossomas e controlar a qualidade dos mesmos durante, entre e após a sua preparação.

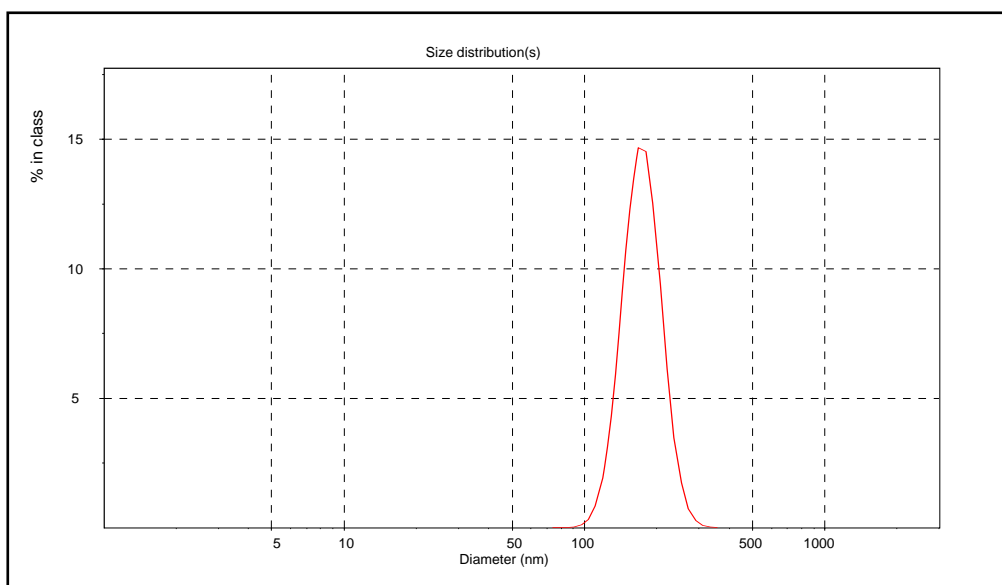
As determinações foram feitas por “Dynamic Laser Light Scattering” no aparelho de determinação de tamanho de partículas Zeta Sizer 1000 HSA (Malvern Instruments, Reino Unido) (**Figura III. 8.**). A técnica consiste em fazer incidir uma radiação laser (hélio e néon ou árgon) numa cuvete com a amostra, a uma dada temperatura e em monitorizar a difracção da luz provocada pelos movimentos das partículas em suspensão. A cuvete de secção transversal quadrada (para medição num ângulo de  $90^{\circ}$  relativamente ao feixe de laser) é “alojada” numa célula goniométrica termostaticamente controlada. Deste modo, minimizam-se as correntes de convecção aleatória sobrepostas no movimento

Browniano e qualquer erro potencial devido à variação de viscosidade do fluido. A correlação entre a variação da difracção e a distribuição de tamanhos para a amostra estudada é efectuada por um autocorrelacionador que processa a informação num computador com um software específico para o cálculo do diâmetro das partículas da amostra e tratamento estatístico da mesma. As suspensões de lipossomas são previamente diluídas (1/20) em meio aquoso (NaCl 154 mM) de modo a diminuir a opacidade da suspensão, permitindo um melhor índice de refracção do meio.



**Figura III. 8.** - Aparelho de determinação de tamanho de partículas Zeta Sizer 1000 HSA (Malvern Instruments ,Reino Unido).

Os resultados são impressos num relatório como o que está representado na **Figura III. 9.**, onde se pode retirar informação acerca do número de populações presentes, do diâmetro médio (Zave em nm) e da polidispersão, ou seja a variação em torno do valor para o diâmetro médio obtido (Poly.Index), em que o valor **1** corresponde a uma suspensão totalmente dispersa e o **0** a uma monodispersa.



**Figura III. 9. -** Exemplo de um relatório impresso após a determinação do diâmetro médio de uma população de lipossomas.  
Neste exemplo, o diâmetro médio (Zave(nm)) dos lipossomas é de 172,9 nm e a polidispersão (Poly.Index) é de 0,0339.

#### 2.2.4 – Determinação do potencial zeta dos lipossomas

De modo a caracterizar as vesículas pela sua carga superficial, foi medido o potencial zeta utilizando o aparelho Malvern Zeta Sizer 2000 (Malvern Instruments, Reino Unido).

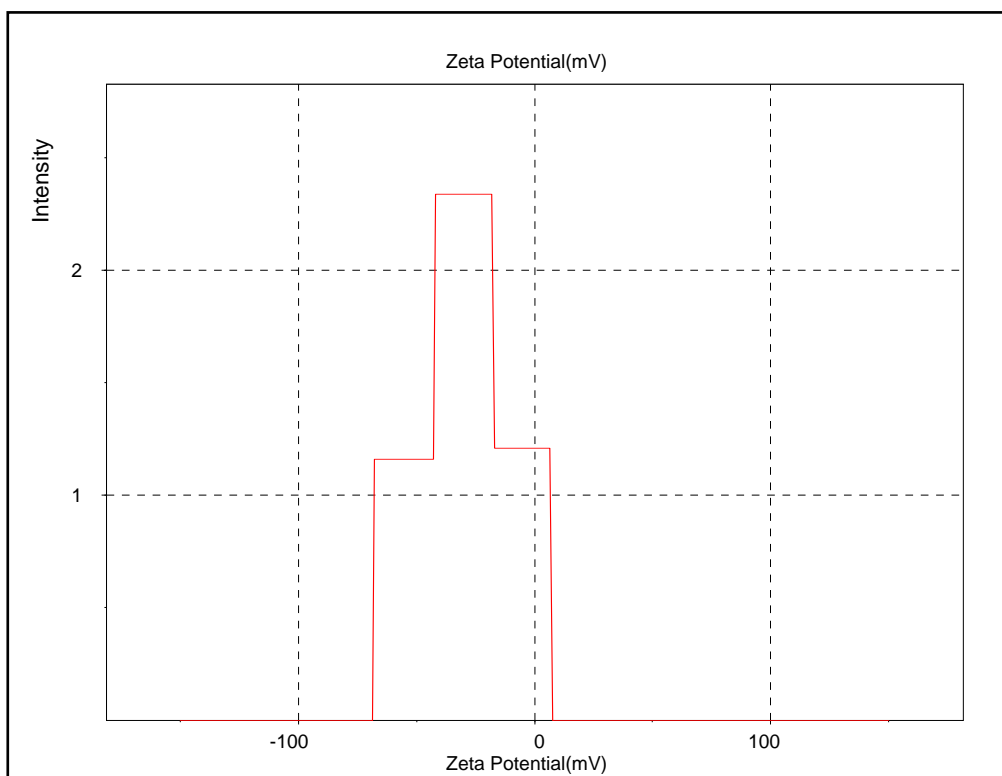
O potencial zeta ( $\zeta$ ), expresso em mV, é definido como a diferença de potencial existente entre o meio de dispersão e a primeira camada de solvente em redor da partícula (também designada plano de corte) e que representa uma esfera imaginária na qual o solvente se desloca acompanhando o movimento da partícula.

A técnica consiste em sujeitar uma amostra a uma microelectroforese e simultaneamente, determinar o movimento das partículas por “Dynamic Laser Light Scattering”. A amostra é aplicada num pequeno capilar com um eléctrodo em cada extremidade e submetida a um campo eléctrico que implica deslocação das partículas da amostra. A velocidade que as partículas adquirem, para um dado campo eléctrico, é designada por mobilidade electroforética e pode ser determinada para um dado volume de amostra. Assim, as partículas existentes num pequeno volume, que corresponde à zona de cruzamento dos feixes laser, produzem difracção da luz que oscila no tempo de uma forma que dependerá da sua mobilidade. Esta difracção é captada por um detector (fotomultiplicador), e sua intensidade é correlacionável com a mobilidade electroforética.

Esta conversão é realizada por um autocorrelacionador que, por sua vez, envia toda a informação a um computador, com um software específico, para o cálculo do potencial zeta assim como todo o tratamento estatístico dos resultados.

As amostras são preparadas por diluição das formulações num solvente filtrado (NaCl 154 mM) por filtros de porosidade 0,02  $\mu\text{m}$  ou inferior, de modo a obter uma concentração de 3  $\mu\text{mol}$  de lípido/ml de formulação.

Os resultados, impressos num relatório (**Figura III. 10.**), fornecem informações importantes acerca da carga superficial das vesículas, da sua variação em função dos agentes bioactivos incorporados, da sua estabilização (agregação ou fusão) e do seu comportamento *in vivo*.



**Figura III. 10.** - Exemplo de um relatório impresso após a determinação do potencial zeta de uma população lipossomal.

Neste exemplo, o potencial zeta ( $\zeta$  (mV)) dos lipossomas é de  $-29,6 \text{ mV} \pm 8,9$ .

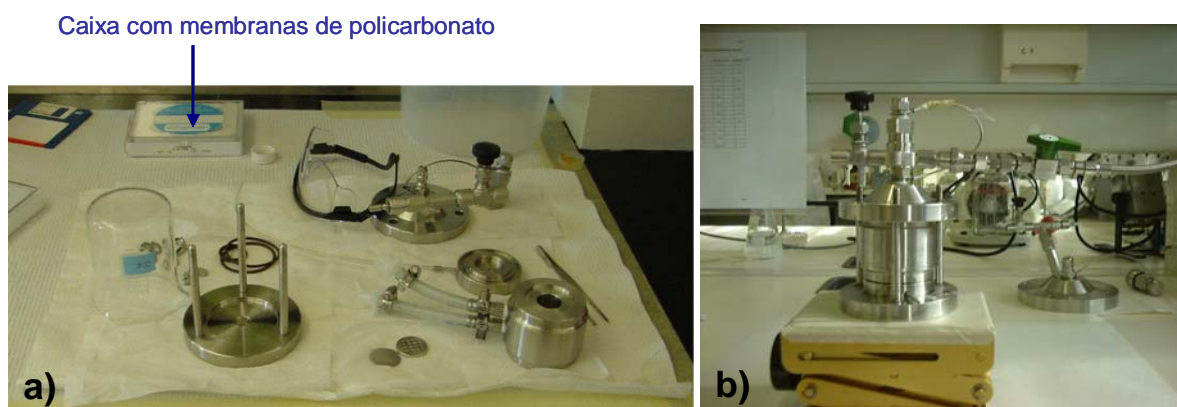
## 2.3 – METODOLOGIAS DE PREPARAÇÃO DE LIPOSSOMAS

Vários tipos de lipossomas (MLV's, SUV's, LUV's, VET's, DRV's, entre outros) podem ser preparados por uma ampla diversidade de métodos, dado os inúmeros mecanismos envolvidos na formação dos lipossomas. Neste trabalho a ORZ incorporada em lipossomas foi preparada utilizando dois métodos diferentes, que irão ser descritos de seguida.

### 2.3.1 – Preparação de VET's com ORZ

A metodologia de preparação de VET's foi já referida na introdução em 3.10 e portanto será apenas descrito sucintamente o procedimento de incorporação de ORZ neste tipo de lipossomas (**Figura III. 12.**).

Os lípidos e a ORZ, numa razão molar de 10:1, foram secos num evaporador rotativo (BUCHI rotavapor RE-111) para evaporação do solvente (clorofórmio) e posteriormente hidratados, com agitação, com uma solução de NaCl 154 mM num volume correspondente a um décimo do volume final. Passado 15 minutos, realizou-se uma segunda fase de hidratação com o mesmo volume de NaCl. O volume final da formulação lipossomal foi completado com a mesma solução (oito décimos do volume final). Estes lipossomas tipo MLV's foram dimensionados e homogeneizados através de extrusão, utilizando para tal um Extruder Lipex Biomembranes, (Vancouver, Canadá) (**Figura III. 11.**). Este processo força, por pressão de azoto, a passagem das formulações lipossomais por membranas de polycarbonato com tamanhos de poro bem definidos até ser atingido o tamanho desejado das vesículas (Nucleopore Filtration Products, Cambridge, E.U.A.).



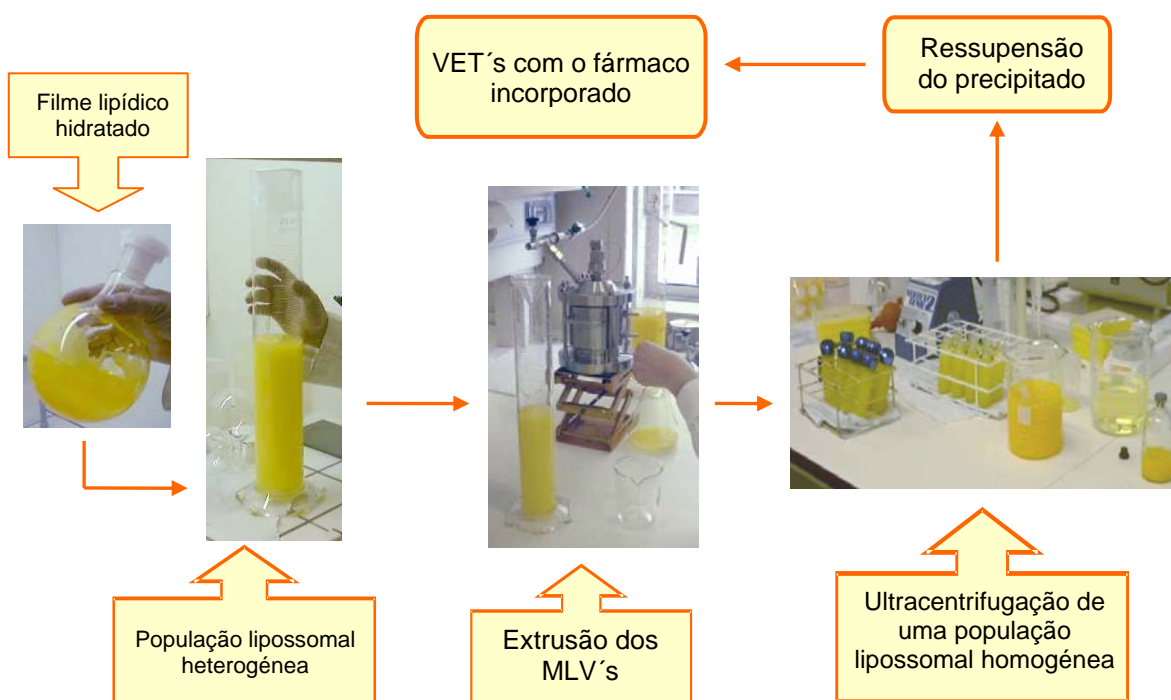
**Figura III. 11.** - a) peças do Extruder. b) disposição de todas as peças para montagem do Extruder Lipex Biomembranes (Vancouver, Canadá).



Normalmente este processo é feito por etapas de filtração através de filtros com diâmetros sucessivamente mais pequenos, por exemplo, 1; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2  $\mu\text{m}$ .

Obteve-se então uma população lipossomal homogénea à qual lhe foi retirado um pequeno volume de amostra para determinações.

De forma a separar a ORZ livre (não incorporada) na superfície dos VET's, da ORZ incorporada na bicamada lipídica, diluiu-se a amostra extrusada 50 vezes em NaCl 154 mM, garantindo a hidrossolubilidade do fármaco (solubilidade da ORZ de 2,5 mg/L), e efectuou-se a ultracentrifugação (Ultracentrifuga – L8-60 M, Beckman Instruments, E.U.A.) a 49 000 rpm (247 130 xg) num rotor tipo 70Ti (Beckman Instruments, E.U.A.) durante duas horas. Assim, eliminou-se a ORZ que não foi incorporada presente no sobrenadante, obtendo-se um precipitado de ORZ lipossomal. Para finalizar a preparação dos VET's com ORZ, ressuspendeu-se o precipitado em NaCl 154 mM até ao volume final pretendido.



**Figura III. 12.** - Etapas de preparação de VET's.  
Adaptado de Pinhal *et al.* (2005) [217].

### 2.3.2 – Preparação de DRV's com ORZ

O método de preparação de DRV's tem como base a liofilização de uma suspensão de lipossomas (MLV's) e a sua re-hidratação (com água) (**Figura III. 13.**).

A etapa inicial de secagem do filme lipídico é idêntica à do método descrito em 2.3.1. A hidratação deste filme lipídico é também realizada em 3 etapas. No entanto, neste caso, foi necessário a adição de um crioprotector, uma vez que a formulação lipossomal de ORZ foi posteriormente sujeita a uma liofilização. A presença de um crioprotector nas duas primeiras fases de hidratação demonstrou ser essencial para os DRV's terem boas eficácias de incorporação, tal facto pode ser observado nos resultados em 1.2. A hidratação trifásica iniciou-se com trealose 300 mM (1/10 do volume final), seguiu-se de uma segunda hidratação com trealose 300 mM (1/10 do volume final) e NaCl 154 mM (volume restante – 8/10 do volume final) na terceira. Ao filme lipídico hidratado foi retirado uma amostra inicial (efectuou-se o mesmo na preparação dos VET's com ORZ).

A suspensão lipossómica foi transferida do balão para frascos de liofilização que foram congelados a -70°C durante 30-45 minutos. Posteriormente, realizou-se uma liofilização (Liofilizador EDWARDS, Modulyo, Alemanha) durante a noite, ao que se seguiu uma re-hidratação com água desmineralizada. A hidratação dos liofilizados fez-se em duas etapas: inicialmente adicionou-se 1/10 do volume total, agitou-se no vortex e após 15 minutos adicionou-se o restante volume. Nesta etapa do processo foi retirado a amostra liofilizada.

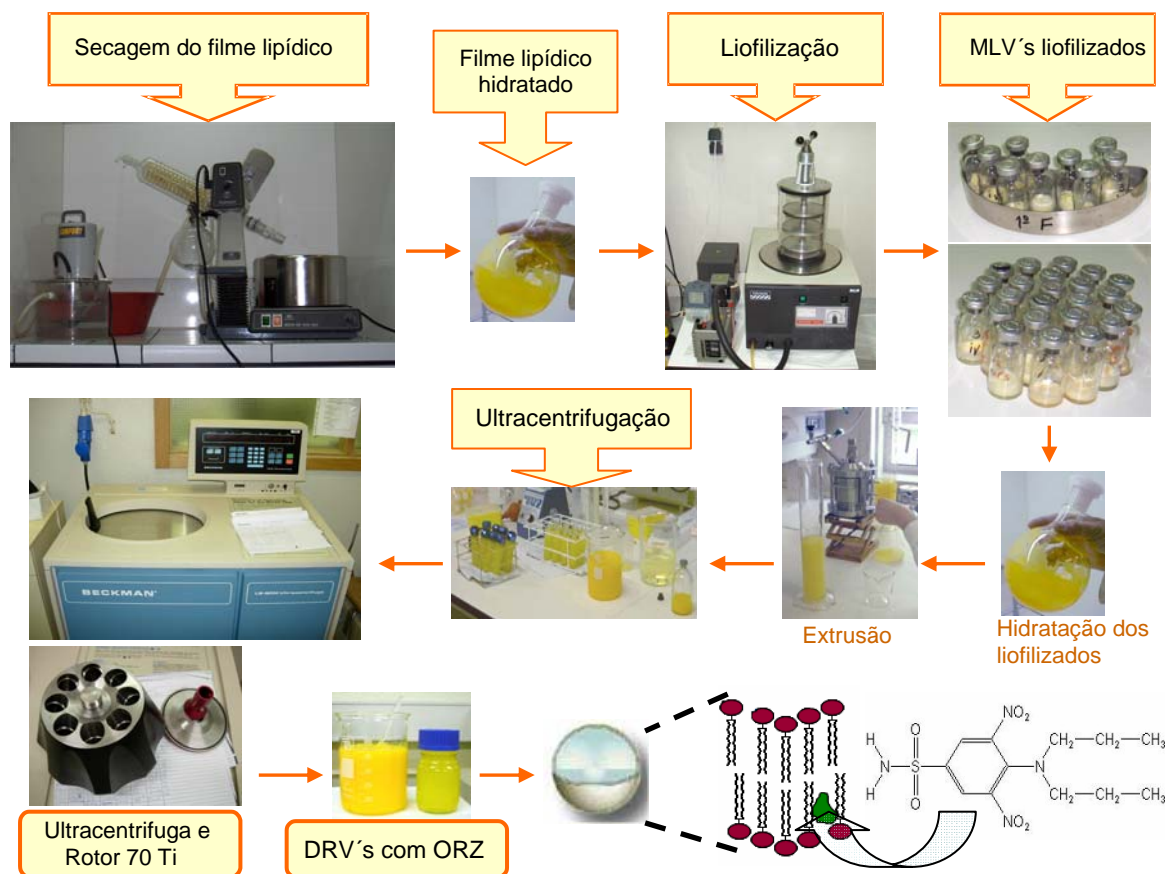
Por fim, efectuaram-se as etapas de extrusão, diluição e ultracentrifugação referenciadas em 2.3.1.

As amostras retiradas serviram para caracterizar a formulação durante as várias fases do processo e são designadas por:

- $A_i$  - amostra inicial após hidratação do filme lipídico;
- $A_{liof}$  – amostra após hidratação dos liofilizados;
- $A_{ext}$  – amostra após extrusão dos lipossomas;
- $A_f$  – amostra final após centrifugação dos lipossomas.

Durante a preparação dos lipossomas utilizou-se uma solução de NaCl a 154 mM e uma de trealose a 300 mM, ambas com uma osmolaridade de 300 mOsm, tendo como finalidade obter formulações lipossomais iso-osmóticas com o soro sanguíneo. Uma vez que as vesículas lipossomais são sensíveis a diferenças de osmolaridade entre o seu

espaço interno e o meio externo, torna-se necessário assegurar que a osmolaridade do seu compartimento interno, seja idêntica à do soro sanguíneo, de modo a que, *in vivo*, mantenham as suas características morfológicas.



**Figura III. 13.** - Etapas de preparação de DRV's com ORZ.

### Análise estatística

Todos os resultados foram submetidos a análise estatística para avaliação da significância das variações, usando o teste de factor simples Anova, para um intervalo de confiança de 95 %.

## 2.4 – DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE DE UMA SUSPENSÃO LIPOSSÓMICA CONTENDO ORIZALINA

Após uma selecção rigorosa das condições mais favoráveis para a incorporação de ORZ em lipossomas, procedeu-se à preparação de DRV's com ORZ, partindo de uma concentração inicial de fármaco de 2  $\mu\text{mol/mL}$  e de uma composição lipídica de PC:PG (4:1), de acordo com a metodologia referenciada em 2.3.2.

As formulações foram caracterizadas quanto às dimensões e polidispersão das vesículas, pelo método descrito em 2.2.3, e quanto aos parâmetros de incorporação, pelos processos referidos em 2.2. As técnicas usadas para o doseamento da ORZ e do lípido foram as descritas em 2.2.1 e 2.2.2, respectivamente.

### 2.4.1 – Estabilidade a 4 °C

O estudo da estabilidade dos lipossomas contendo ORZ, em soro fisiológico, permitiu avaliar a difusão de fármaco para o exterior das vesículas e monitorizar os lipossomas, no que respeita ao diâmetro médio e à homogeneidade das suspensões, durante um período de 11 dias.

Os tempos analisados foram os seguintes: 0, 12, 24, 48, 120 e 264 horas.

O procedimento adoptado consistiu numa diluição prévia (1:1) da suspensão lipossómica, com NaCl 154mM. A suspensão final foi dividida em fracções de 500  $\mu\text{L}$ , rapidamente conservadas no frigorífico a 4 °C. Ao fim dos intervalos de tempo previamente estabelecidos, triplicados de alíquotas foram diluídos 50 vezes e ultracentrifugadas (247 130 xg, 2 horas, 4 °C) de forma a eliminar a ORZ que tenha saído do lipossoma. No final procedeu-se à caracterização das amostras ressuspendidas, realizando-se doseamentos de fármaco, lípido e dimensionamento das vesículas.

### 2.4.2 – Estabilidade a 37 °C

Preparam-se lipossomas do tipo DRV's, com a mesma composição lipídica do ponto anterior. Como o estudo de estabilidade se iniciou na manhã seguinte à preparação dos DRV's, o tempo 0 horas correspondeu a uma dispersão de DRV's conservada no frigorífico durante 12 horas. No dia seguinte à preparação dos DRV's procedeu-se a uma

diluição prévia (1:1) da dispersão lipossômica, com uma solução de BSA a pH 7,4, num tubo Falcon. Esta solução tinha como composição ácido cítrico 10 mM/NaCl 145mM com 2% BSA.

Para o estudo de estabilidade a 37 °C, foram analisadas amostras às 0; 0,5; 4; 8 e 24 horas. Os tempos indicados foram contabilizados desde o instante em que se colocou a suspensão lipossômica com BSA num banho termostatizado a 37 °C. Nesses intervalos de tempo, procedeu-se à colheita de três alíquotas, efectuando-se em cada uma, a determinação de ORZ, lípido e diâmetros. A separação dos lipossomas do meio extralipossômico processou-se por diluição (50 vezes) e ultracentrifugação a 278 317 xg, à temperatura de 4 °C, durante 4 horas e 30 minutos.

Para excluir a existência de ORZ livre co-precipitada com os lipossomas foi feita uma observação ao microscópio das dispersões estudadas. Em tal eventualidade os cristais ou precipitado de ORZ na superfície externa dos lipossomas seriam visíveis e rejeitados por uma centrifugação de bancada a 10 000 xg, durante 10 minutos.

## 2.5 – ESTABELECIMENTO DO MODELO ANIMAL DE LEISHMANIOSE VISCERAL

Durante o desenvolvimento galénico de ORZ lipossomal estabeleceu-se um modelo animal de leishmaniose visceral para avaliação da actividade terapêutica da ORZ, quer na forma lipossomal quer na forma livre.

### 2.4.1 - Animais

Usaram-se 40 murganhos BALB/c macho, com cerca de 5 semanas de idade e pesando cerca de 20g.

Os animais foram adquiridos no Instituto Gulbenkian de Ciência (Fundação Callouste Gulbenkian, Oeiras, Portugal) e, durante o estudo, foram mantidos com água acidificada (pH = 3) e ração (Panlab A04, Portugal), no biotério do Departamento de Biotecnologia do Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação (Lisboa, Portugal).

#### 2.4.2 – Inoculação da estirpe *L. infantum* – MON-1(MCAN/PT/94/IMT 205)

Os animais foram infectados, por via intra peritoneal (i.p.), com 0,1 mL de uma solução de promastigotas a  $1 \times 10^7$ /mL (**Figura III. 14.**). Os promastigotas foram gentilmente cedidos pela Dra. Gabriela Santos Gomes da Unidade de Leishmanioses/Centro de Malária e Outras Doenças Tropicais do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (Lisboa, Portugal).



**Figura III. 14.** - Murgancho BALB/c infectado por i.p. com  $1 \times 10^6$  promastigotas.

#### 2.4.3 – Estudos parasitológicos

Neste trabalho foram utilizados dois métodos para a determinação da carga parasitária no baço dos murganchos BALB/c, a impressão em lâmina e a diluição limite, que irão ser descritos de seguida.

Serão também descritos todos os procedimentos efectuados para a detecção dos parasitas pelos dois métodos utilizados.

##### **Método das impressões em lâmina**

Foi preparado e esterilizado com antecedência todo o material necessário (ver **Tabela III. 3.**).

**Tabela III. 3. -** Material e reagentes utilizados para o estudo parasitológico.

Reagentes	Material	Esterilização em autoclave (121°C durante 60 minutos)
Pulverizador com Etanol a 70 %	Luvas	-
Lixívia	Frasco SCHOTT 250 mL	+
Esguicho com Metanol a 100%	Potters com tampa	+
Giemsa	Pinças largas	+
Soro Fetal Bovino (FBS)	Tesoura	+
Meio Schneider (Gibco BRL)	Bisturi	+
Meio NNN (NOVY, MACNEAL and NICOLLE)	Caixa de lâminas e lamelas	-
Bacto-agar (Difco)	Marcador de vidro	-
NaCl (Merck)	Barquinhos	+
Água desmineralizada	Microplaca de 96 poços	-
Sangue de coelho desfibrinado	Micropipeta muticanal	-
-	Caixa de pontas	+

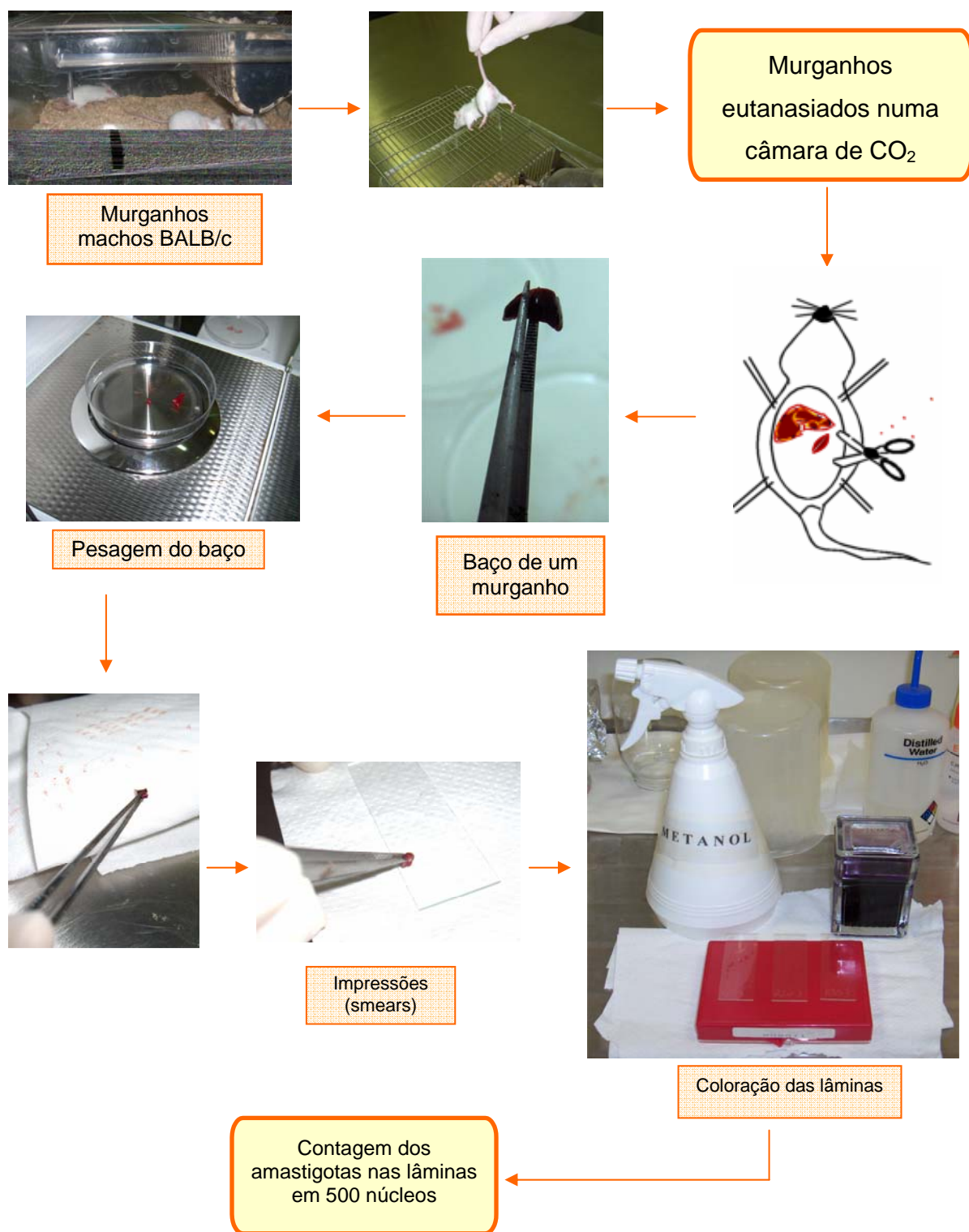
Em tempos previamente estabelecidos após a infecção, grupos de 3 animais foram eutanasiados com uma pressão baixa de CO<sub>2</sub> (garrafa de CO<sub>2</sub> ligada a uma caixa) de forma a adormecer primeiro e eutanasiar depois (10 a 15 minutos).

Na câmara de fluxo laminar, lavou-se a pele e o abdómen com etanol a 70% e, depois de aberta a cavidade abdominal, removeu-se o baço e pesou-se numa balança analítica (Precisa 205 A SCS, Suíça) (**Figura III. 15.**). De seguida, cortou-se uma pequena extremidade do baço com aproximadamente 0,01g e colocou-se num frasco com meio Schneider contendo 20 % de FBS. Em simultâneo, com a secção transversal cortada imprimiu-se uma lâmina de vidro, por cada animal, com toques suaves. Fizeram-se cerca de 40 impressões (smears) por lâmina com o mínimo de sangue possível. Seguiu-se uma pulverização das lâminas com metanol a 100% para fixar as impressões. Posteriormente, deixaram-se secar e colocaram-se numa câmara contendo uma solução do agente corante Giemsa diluído com água (Giemsa:H<sub>2</sub>O 1:10). A coloração de Giemsa diferencia a morfologia nuclear e citoplasmática do parasita, permitindo a sua detecção.

Passados 45 minutos, procedeu-se a uma lavagem das lâminas com água. As lâminas secas foram então observadas ao microscópio óptico para avaliação da infecção, determinando-se o número de amastigotas no baço pela equação de Stauber [218]:

$$\frac{n^{\circ} \text{ amastigotas}}{n^{\circ} \text{ de núcleos}} \times \text{peso do órgão (mg)} \times (2 \times 10^5) = n^{\circ} \text{ amastigotas / órgão}$$





**Figura III. 15.** - Esquematização das etapas do método de impressões em lâmina.



### Método de Diluição limite (adaptado de Buffet *et al.* (1995) [219])

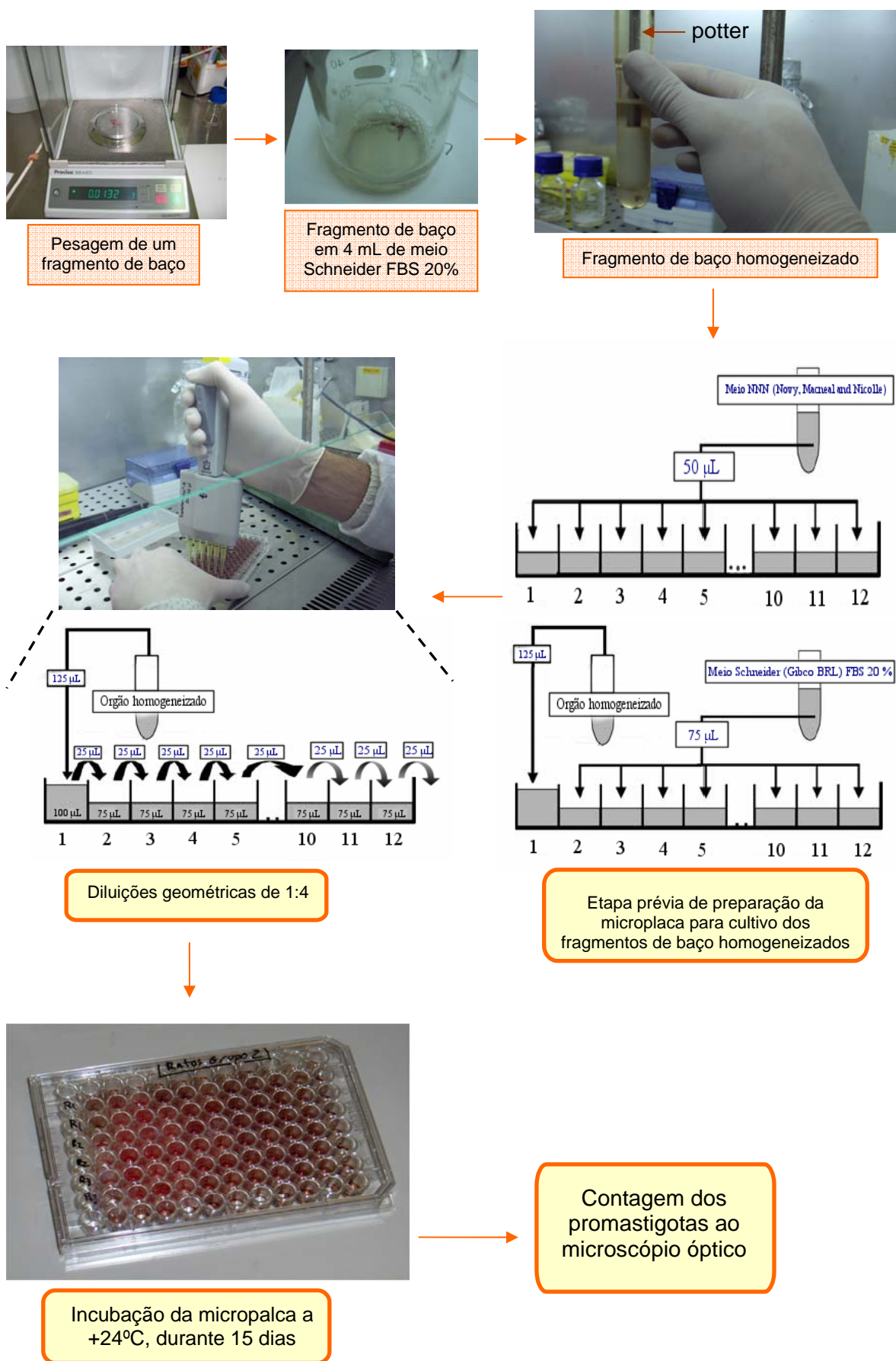
Como confirmação do método de impressões em lâmina, efectuou-se o método de diluição limite que apesar de permitir observar os resultados apenas 15 dias após a colheita do órgão, possui um limite de detecção 50 a 100 vezes superior [219]. Buffet observou em 1995 que em murganhos BALB/c infectados com *L. infantum* a detecção por impressões de baço seria sempre negativa abaixo de  $10^5$  promastigotas por grama de baço e seria sempre positiva acima de  $10^6$  promastigotas por grama. Comparativamente, observou que pelo método de diluição limite a detecção poderia ser possível com  $10^3$  promastigotas por grama de baço. Também realizou uma comparação exaustiva entre os dois métodos, demonstrando terem uma boa correlação (coeficiente de correlação de 0,869) [219].

Para a determinação quantitativa da carga parasitária pelo método de diluição limite, foi necessário a preparação prévia de um meio de cultura para insectos que permita o crescimento dos promastigotas. Assim, foi adicionado 50  $\mu$ L de meio NNN (sólido) a todos os poços de uma microplaca de 96 poços de fundo em U (Nunc). De seguida colocou-se 75  $\mu$ L de meio Schneider FBS 20% (meio de cultura para insectos suplementado com soro fetal bovino) em cada poço da mesma com excepção do primeiro poço de cada linha (**Figura III. 16.**).

Os fragmentos de baço de 0,01g foram homogeneizados com o potter em 4 mL de meio Schneider FBS 20%. Do homogeneizado do órgão foram retirados 125  $\mu$ L e inoculados nos poços da primeira coluna da microplaca, tendo-se efectuado diluições geométricas de 1:4 para os poços seguintes. Para cada amostra de órgão foram efectuadas duas réplicas. Após 15 dias de incubação a +24°C, foi retirado 10  $\mu$ L de cada diluição e observou-se ao microscópio óptico a presença de promastigotas. Por fim, o número de parasitas viáveis por grama de órgão poderá ser calculado (n.º parasitas viáveis /g órgão) com base na seguinte fórmula [219-221]:

$$\frac{\text{recíproco do título da maior diluição com presença de promastigotas}}{\text{peso do fragmento de baço usado (g)}} \times 400$$

Baseando-se na fórmula anterior, determina-se a carga parasitária como sendo o  $\log_{10}$  (nº parasitas viáveis /g órgão).



**Figura III. 16.** - Esquemática das etapas do método de diluição limite.

### **III. – PARTE EXPERIMENTAL**



## 1 – ESQUEMA DO TRABALHO REALIZADO

O trabalho desenvolvido pode ser dividido em três partes:

- I. Desenvolvimento e optimização de métodos apropriados para a incorporação de orizalina em lipossomas. Tal será feito através da incorporação do fármaco em diferentes tipos de lipossomas, fazendo variar diversos parâmetros, como a composição lipídica (nomeadamente pela inclusão de colesterol), o método de preparação e a utilização de crioprotectores.

Será feita a caracterização das formulações sob o ponto de vista físico-químico, nomeadamente em termos do diâmetro médio das vesículas, da composição lipídica, das razões fármaco/lípido iniciais e finais, da concentração intra-lipossomal de fármaco, da eficácia de incorporação e do potencial zeta. Esta caracterização será feita, utilizando os seguintes métodos:

- Método de Rouser para o doseamento de fosfolípidos.
- Método espectrofotométrico para o doseamento de orizalina.

- II. Selecção das formulações mais apropriadas para realização de testes de estabilidade e para futura utilização *in vivo*.

Nesta fase da tese serão realizados estudos de estabilidade, com as formulações desenvolvidas, a 4 °C (condição de armazenamento) e a 37 °C em albumina sérica bovina (BSA) (simulação do comportamento dos lipossomas *in vivo*).

- III. Realização de testes de actividade biológica com uma formulação lipossomal seleccionada nas fases anteriores. Esta fase inclui o estabelecimento e verificação de um modelo animal de leishmaniose visceral, através de um inoculo da estirpe de *Leishmania infantum* MON-1 (MCAN/PT/94/IMT 205) para avaliação da actividade terapêutica da orizalina.

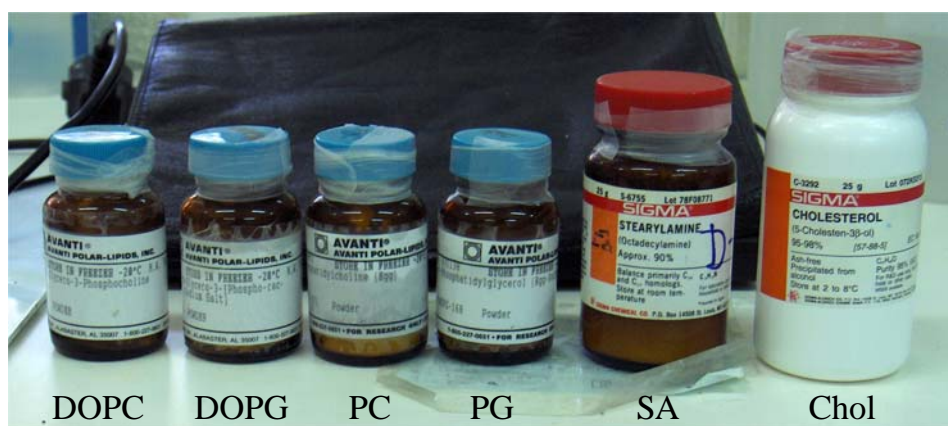
## 2 – MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 – LÍPIDOS E REAGENTES

A orizalina utilizada no trabalho foi adquirida à Supelco, E.U.A. Os fosfolípidos, fosfatidilcolina (PC), fosfatidilglicerol (PG), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), foram adquiridos à Avanti Polar Lipids, Inc. (E.U.A).

O colesterol (Chol), a estearilamina (SA) e a albumina sérica bovina (BSA) foram adquiridos à Sigma - Aldrich Chemie (Alemanha) (**Figura III. 1.**).

Todos os restantes reagentes e solventes utilizados são de grau analítico.



**Figura III. 1.** - Lípidos comerciais utilizados na preparação de lipossomas.

### 2.2 – MÉTODOS DE DOSEAMENTO E PARÂMETROS UTILIZADOS PARA A CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES

De forma a caracterizar as formulações lipossomais foram efectuados doseamentos de fármaco, ou seja de orizalina (ORZ) e de lípido e, foram, também, determinados a carga superficial e o diâmetro das vesículas que serão descritos posteriormente. Com os resultados obtidos, foram calculados vários parâmetros que irão servir para caracterizar estes sistemas do ponto de vista físico-químico.

Os parâmetros utilizados para caracterizar as formulações lipossomais foram: razão fármaco/lípido inicial  $[ORZ/Lip]_{(i)}$  (g/mol), razão fármaco/lípido final  $[ORZ/Lip]_{(f)}$  (g/mol), rendimento em fármaco  $(ORZ_{(f)}/ORZ_{(i)})$  (%), rendimento em lípido  $(Lip_{(f)}/Lip_{(i)})$

(%) e eficácia de incorporação (E.I.) (%) definida como a razão entre a  $[ORZ/Lip]_{(f)}$  e a  $[ORZ/Lip]_{(i)}$  (**Equação III.1.**) [176; 214; 215].

$$E.I = \frac{[ORZ / Lip]_{(f)}}{[ORZ / Lip]_{(i)}} \times 100 \quad \text{(Equação III.1.)}$$

$ORZ_{(i)}$  – orizalina inicial;  $ORZ_{(f)}$  – orizalina retida nos lipossomas;

$Lip_{(i)}$  – lípido inicial;  $Lip_{(f)}$  – lípido após centrifugação organizado em lipossomas

Este parâmetro é a medida da eficiência do sistema inicial,  $(\text{fármaco/lípido})_{(i)}$ , para incorporar o fármaco na forma lipossomal final  $(\text{fármaco/lípido})_{(f)}$ .

### 2.2.1 – Doseamento de Orizalina por um método espectrofotométrico.

O método utilizado para o doseamento de ORZ foi a espectrofotometria directa utilizando para tal um Espectrofotómetro Shimadzu UV-160A (Shimadzu, Japão) com posicionador/termostatizador incorporado (modelo CPS-240A, Shimadzu, Japão) (**Figura III. 2.**).



**Figura III. 2.** - Espectrofotómetro Shimadzu UV-160A com posicionador/termostatizador incorporado modelo CPS-240A (Japão).

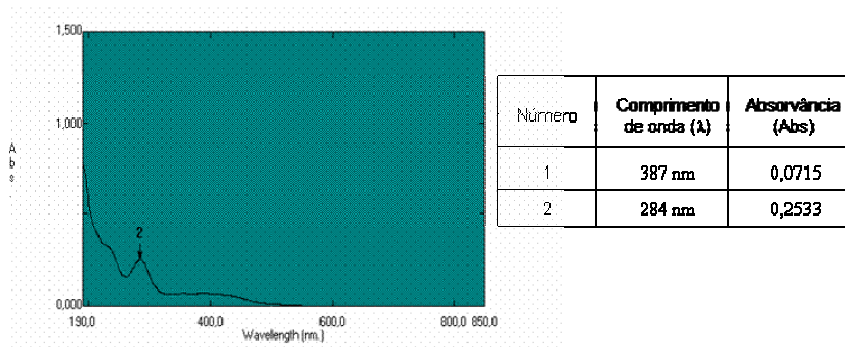
Este método tem como base a absorção específica da ORZ a 284 nm (**Figura III. 3.**). A absorvância é determinada após ruptura dos lipossomas em acetonitrilo e água. A

quantificação de ORZ é realizada por interpolação numa curva de calibração da ORZ em acetonitrilo e água.

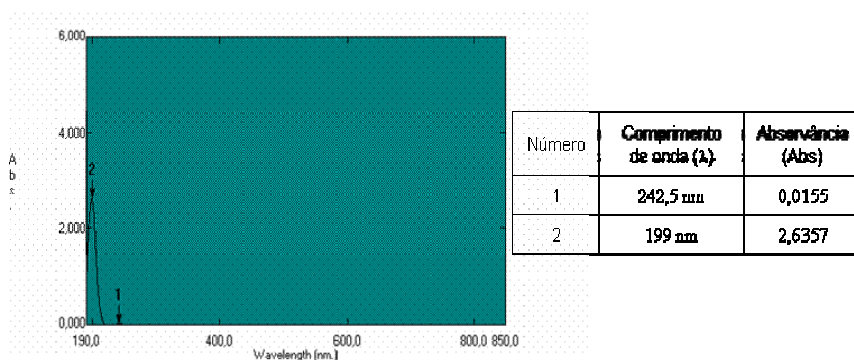
## Protocolo experimental

Numa primeira fase foram realizados vários espectros de ORZ dissolvida em solventes (acetonitrilo e água) de modo a obter-se um comprimento de onda ao qual a orizalina a teria um pico de absorção máximo (**Figura III. 3.** a **Figura III. 5.**). A descrição pormenorizada da montagem da técnica está no ANEXO I.

Observou-se que os lípidos (PC e PG) têm um pico de absorção máximos ao comprimento de onda de 199 nm e que a absorção dos solventes utilizados é nula, confirmando que ao comprimento de onda de 284 nm apenas o fármaco é absorvido.

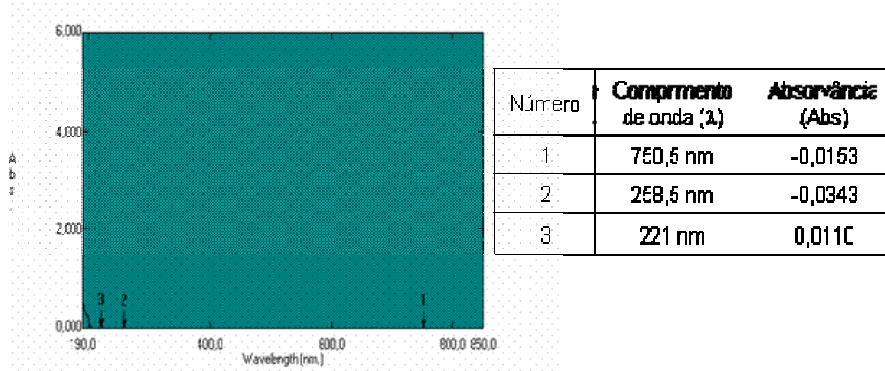


**Figura III. 3.** - Espectro de absorção de orizalina com uma concentração de 5 µg/mL, (concentração teórica de ORZ, após diluição de 1/60) obtido por varrimento de comprimento de onda entre 190 e 850nm.



**Figura III. 4.** - Espectro de absorção de lipossomas vazios de composição lipídica PC:PG (4:1), com uma concentração de 0,17 µmol/mL (concentração dos lipossomas após diluição de 1/60), obtido por varrimento de comprimento de onda entre 190 e 850 nm.





**Figura III. 5.** - Espectro de absorção de uma solução de 20 % (v/v) de acetonitrilo e 80 % (v/v) de água, obtido por varrimento de comprimento de onda entre 190 e 850 nm.

Preparou-se uma solução stock de ORZ a 50 µg/mL em acetonitrilo (100 %) adquirido à Riedel-de Haen (Alemanha). De seguida, procedeu-se a uma diluição de modo a obter uma solução com a razão pretendida (20 por cento de acetonitrilo e 80 por cento de água desmineralizada) (**Equação III.2.**)

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

$$C_f = [P_{\text{máx}}] = \frac{(50 \mu\text{g} / \text{mL}) \times (4 \text{ mL})}{(20 \text{ mL})} \quad (\text{Equação III.2.})$$

$$[P_{\text{máx}}] = 10 \mu\text{g} / \text{mL}$$

$C_i$  – Concentração inicial

$V_i$  – Volume inicial

$C_f$  – Concentração final

$V_f$  – Volume final

Para efectuar a curva de calibração foram preparados 5 mL de soluções de ORZ a 8; 6; 5; 4 e 2 µg/mL a partir da solução de 10 µg/mL (Padrão máximo –  $P_{\text{máx}}$ ), perfazendo-se cada uma destas soluções com uma solução de acetonitrilo e água desmineralizada (Ac/H<sub>2</sub>O) na mesma razão do padrão máximo (20% acetonitrilo + 80% água desmineralizada) (**Tabela III. 1.**)

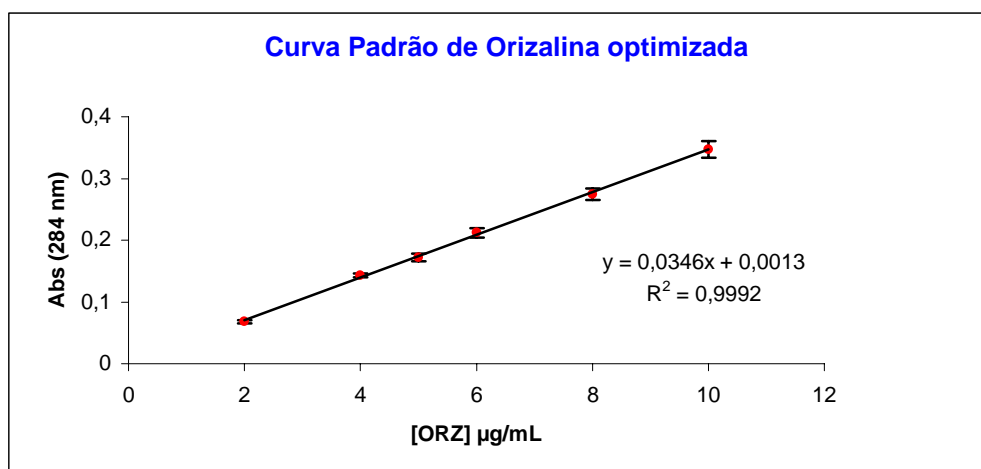
Preparou-se também uma formulação de lipossomas vazios de PC:PG 4:1, com uma concentração de lípido total de 10 µmol/mL, para ser adicionada a todos os pontos da curva de calibração de forma a simular a presença de lipossomas nas amostras reais .

**Tabela III. 1.** - Preparação da curva de calibração para o doseamento de ORZ por espectrofotometria directa.

Padrões	ORZ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Volume inicial (mL)	Solução Ac/H <sub>2</sub> O
P <sub>1</sub>	10	-	-
P <sub>2</sub>	8	4	1
P <sub>3</sub>	6	3	2
P <sub>4</sub>	5	2,5	2,5
P <sub>5</sub>	4	2	3
P <sub>6</sub>	2	1	4

Nota: De modo a otimizar a curva padrão de orizalina foram efectuados triplicados para cada ponto da curva.

Foi então efectuada a leitura da absorvância a 284 nm e registados os valores obtidos para cada Padrão, obtendo-se a recta de calibração (**Figura III. 6.**)



**Figura III. 6.** - Curva de calibração obtida pela leitura de absorvância a 284 nm de várias soluções de ORZ dissolvidas em 20 por cento de acetonitrilo e 80 por cento de água. Os resultados apresentados representam a média e o desvio padrão de 3 experiências independentes.

A preparação das amostras irá depender da concentração de ORZ inicial utilizada na preparação dos lipossomas. Assim, as amostras a serem lidas no espectrofotómetro

foram preparadas por diluição de 20 µL de lipossomas com ORZ em acetonitrilo e água desmineralizada, mantendo a razão acetonitrilo:água de 20:80. Exemplo:

- Amostras preparadas partindo de uma concentração de ORZ(i) de 1 µmol/mL:

(1/60)

**20 µL de Am + 240 µL de Acetonitrilo + 940 µL de H<sub>2</sub>Od**

- Amostras preparadas partindo de uma concentração de ORZ(i) de 2 µmol/mL:

(1/90)

**20 µL de Am + 360 µL de Acetonitrilo + 1 420 µL de H<sub>2</sub>Od**

Am – Amostra

H<sub>2</sub>Od – Água desmineralizada

ORZ(i) – Orizalina inicial

A concentração final das amostras foi obtida pela leitura de triplicados de cada amostra, nas condições referidas acima, por interpolação do valor da mediana na curva de calibração de ORZ.

### 2.2.2 – Doseamento de fosfolípidos pelo método de Rouser

Para quantificar os fosfolípidos que constituem os lipossomas, utilizou-se o método de Rouser [216]. Este método baseia-se na determinação colorimétrica do fosfato inorgânico. Os componentes fosfolipídicos dos lipossomas podem ser determinados após hidrólise dos fosfolípidos com ácido perclórico em fosfatos inorgânicos. O fosfato inorgânico em presença do molibdato de amónio é convertido a ácido fosfomolibdico que é reduzido pela adição de ácido ascórbico, formando um complexo azul após aquecimento. A reacção tem a duração de 5 minutos quando feita num banho termostatzado a 100 °C. O composto corado pode ser determinado por leitura de absorvância no visível, a 797 nm.

## Protocolo experimental

Nesta técnica é usual a preparação prévia da solução padrão de fosfato ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) 0,5 mM e da solução de molibdato de amónio a 1,25% que podem ser guardadas a 4 °C para futuras utilizações. Por outro lado, a solução de ácido ascórbico a 5%, deverá ser preparada em cada doseamento para não haver risco de oxidação pela luz. Para cada doseamento é efectuada uma curva de calibração (ver **Tabela III. 2.**). Para tal colocam-se em tubos devidamente identificados, os volumes de solução padrão ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,5mM) necessários de modo a obter as seguintes quantidades de fosfato inorgânico: 0,02; 0,03; 0,04; 0,05; 0,06 e 0,08  $\mu\text{mol}$ . Acrescentam-se também dois tubos referentes ao branco. Tanto os padrões como o branco irão sofrer o mesmo tratamento a que são sujeitas as amostras e que irá ser descrito posteriormente. Normalmente é necessário efectuar uma diluição prévia das amostras (1:10), para as leituras se encontrarem dentro da curva padrão.

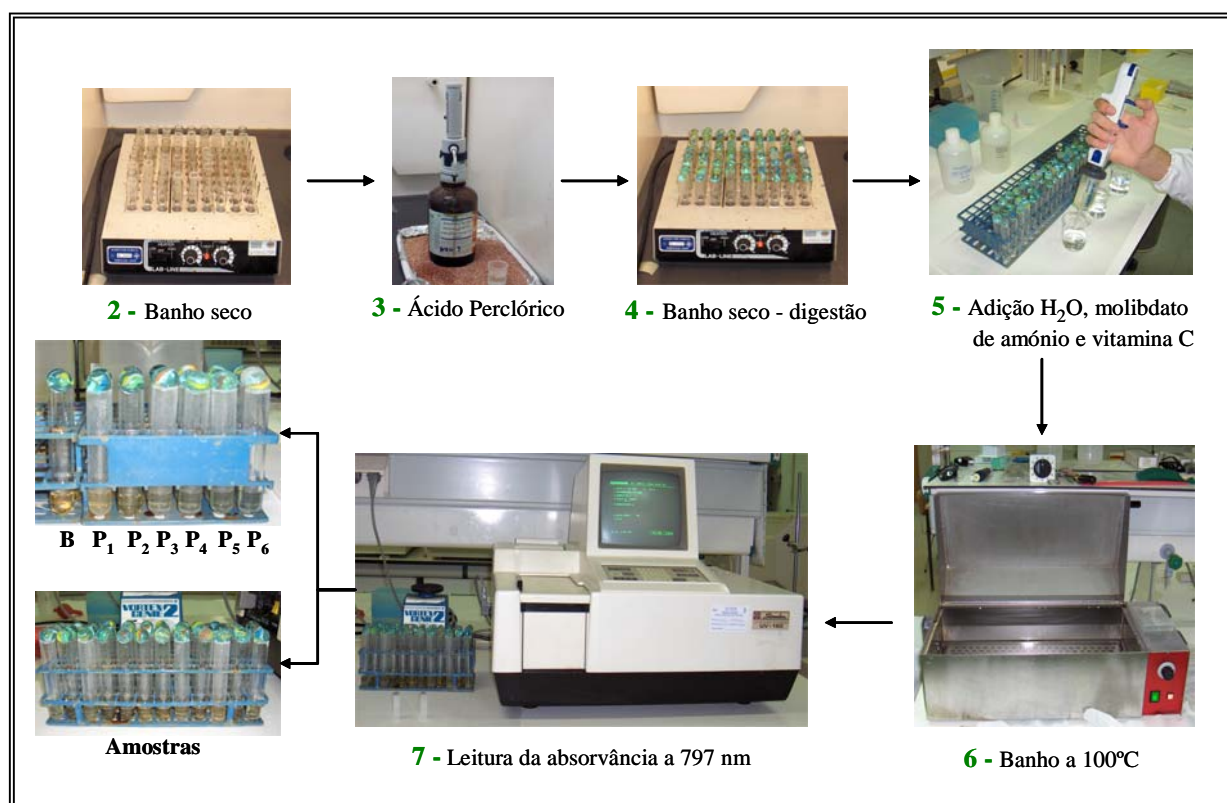
Após realizada a diluição são colocados 50  $\mu\text{L}$  de cada amostra, em triplicado, em tubos também devidamente identificados. Todos os tubos são aquecidos na unidade de aquecimento de tubos (Lab-Line Multi-Block, E.U.A.) até à secura total. De seguida, retiram-se os tubos do aquecimento, deixam-se arrefecer completamente e adicionam-se 300  $\mu\text{L}$  de ácido perclórico 70% (Merck, Alemanha). De seguida, submetem-se os tubos a aquecimento a 170°C durante cerca de 45 minutos ou até se verificar o desaparecimento da coloração. Como já foi referido, é neste passo que ocorre a hidrólise dos fosfolípidos e libertação do fosfato que irá ser doseado.

Removem-se os tubos da unidade de aquecimento e deixam-se arrefecer completamente à temperatura ambiente, adicionando-se seguidamente 1 ml de água, 400 $\mu\text{L}$  de molibdato de amónio (Riedel de Haen, Alemanha) a 1,25%, 400  $\mu\text{L}$  de ácido ascórbico (Riedel de Haen, Alemanha) a 5% e promove-se a homogeneização da mistura. Colocam-se os tubos no banho termostatzado a 100°C (Salvis WKV25, Rotkreuz, Suíça) durante 5 minutos para se dar a reacção. Após arrefecimento total dos tubos é efectuada a leitura da absorvância a 797nm (Espectrofotómetro Shimadzu UV-160, Japão). Esta leitura deverá ser efectuada contra o “branco” (**Figura III. 7.**).

**Tabela III. 2.** - Etapas para a quantificação espectrofotométrica de fosfolípidos constituintes dos lipossomas.

Etapas	Identificação	Branco (n= 2)	Padrões (n = 3)						Amostras (n = 3)		
		nB	nP <sub>1</sub>	nP <sub>2</sub>	nP <sub>3</sub>	nP <sub>4</sub>	nP <sub>5</sub>	nP <sub>6</sub>	nA <sub>i</sub>	nA <sub>ext</sub>	nA <sub>F</sub>
1)	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,5 mM (μL)	-	40	60	80	100	120	160	-	-	-
	Amostras diluídas (1:10) (μL)	-	-	-	-	-	-	-	50	50	50
2)	Lab-Line Multi-Block	Banho seco (evaporar até à secura)									
3)	Ácido perclórico 70% (μL)	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
4)	Lab-Line Multi-Block + Berlindes	Banho seco – digestão (aquecer a 170°C durante 45 min.)									
5)	H <sub>2</sub> O (μL)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
	Molibdato de amónio 1,25%(μL)	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400
	Ácido ascórbico 5% (μL)	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400
6)	Banho a 100°C durante 5 min.										
7)	Abs. 797 nm										

A<sub>i</sub> – Amostra inicial; A<sub>ext</sub> – Amostra extrusada; A<sub>F</sub> – Amostra final.



**Figura III. 7.** - Representação esquemática das etapas de doseamento de fosfolípidos pelo método de Rouser.

### 2.2.3 – Determinação do diâmetro médio dos lipossomas

Os métodos para a determinação do diâmetro médio dos lipossomas para além de variarem na complexidade e no grau de sofisticação, exigem equipamentos de elevado custo. Estes métodos fornecem uma informação precisa acerca do perfil de uma população lipossomal, permitindo analisar as variações de tamanhos dos lipossomas e controlar a qualidade dos mesmos durante, entre e após a sua preparação.

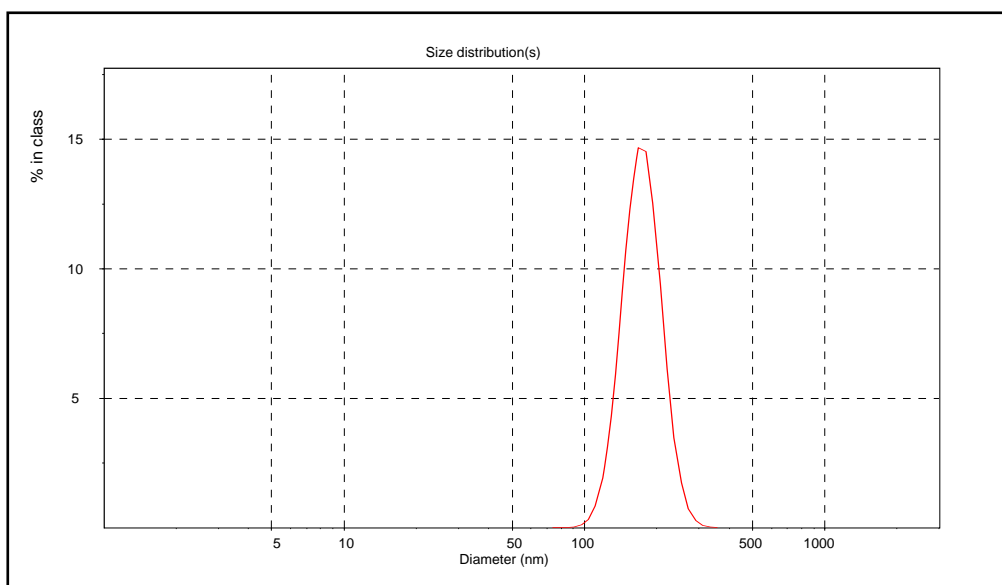
As determinações foram feitas por “Dynamic Laser Light Scattering” no aparelho de determinação de tamanho de partículas Zeta Sizer 1000 HSA (Malvern Instruments, Reino Unido) (**Figura III. 8.**). A técnica consiste em fazer incidir uma radiação laser (hélio e néon ou árgon) numa cuvete com a amostra, a uma dada temperatura e em monitorizar a difracção da luz provocada pelos movimentos das partículas em suspensão. A cuvete de secção transversal quadrada (para medição num ângulo de  $90^{\circ}$  relativamente ao feixe de laser) é “alojada” numa célula goniométrica termostaticamente controlada. Deste modo, minimizam-se as correntes de convecção aleatória sobrepostas no movimento

Browniano e qualquer erro potencial devido à variação de viscosidade do fluido. A correlação entre a variação da difracção e a distribuição de tamanhos para a amostra estudada é efectuada por um autocorrelacionador que processa a informação num computador com um software específico para o cálculo do diâmetro das partículas da amostra e tratamento estatístico da mesma. As suspensões de lipossomas são previamente diluídas (1/20) em meio aquoso (NaCl 154 mM) de modo a diminuir a opacidade da suspensão, permitindo um melhor índice de refracção do meio.



**Figura III. 8.** - Aparelho de determinação de tamanho de partículas Zeta Sizer 1000 HSA (Malvern Instruments ,Reino Unido).

Os resultados são impressos num relatório como o que está representado na **Figura III. 9.**, onde se pode retirar informação acerca do número de populações presentes, do diâmetro médio (Zave em nm) e da polidispersão, ou seja a variação em torno do valor para o diâmetro médio obtido (Poly.Index), em que o valor **1** corresponde a uma suspensão totalmente dispersa e o **0** a uma monodispersa.



**Figura III. 9. -** Exemplo de um relatório impresso após a determinação do diâmetro médio de uma população de lipossomas.  
Neste exemplo, o diâmetro médio (Zave(nm)) dos lipossomas é de 172,9 nm e a polidispersão (Poly.Index) é de 0,0339.

#### 2.2.4 – Determinação do potencial zeta dos lipossomas

De modo a caracterizar as vesículas pela sua carga superficial, foi medido o potencial zeta utilizando o aparelho Malvern Zeta Sizer 2000 (Malvern Instruments, Reino Unido).

O potencial zeta ( $\zeta$ ), expresso em mV, é definido como a diferença de potencial existente entre o meio de dispersão e a primeira camada de solvente em redor da partícula (também designada plano de corte) e que representa uma esfera imaginária na qual o solvente se desloca acompanhando o movimento da partícula.

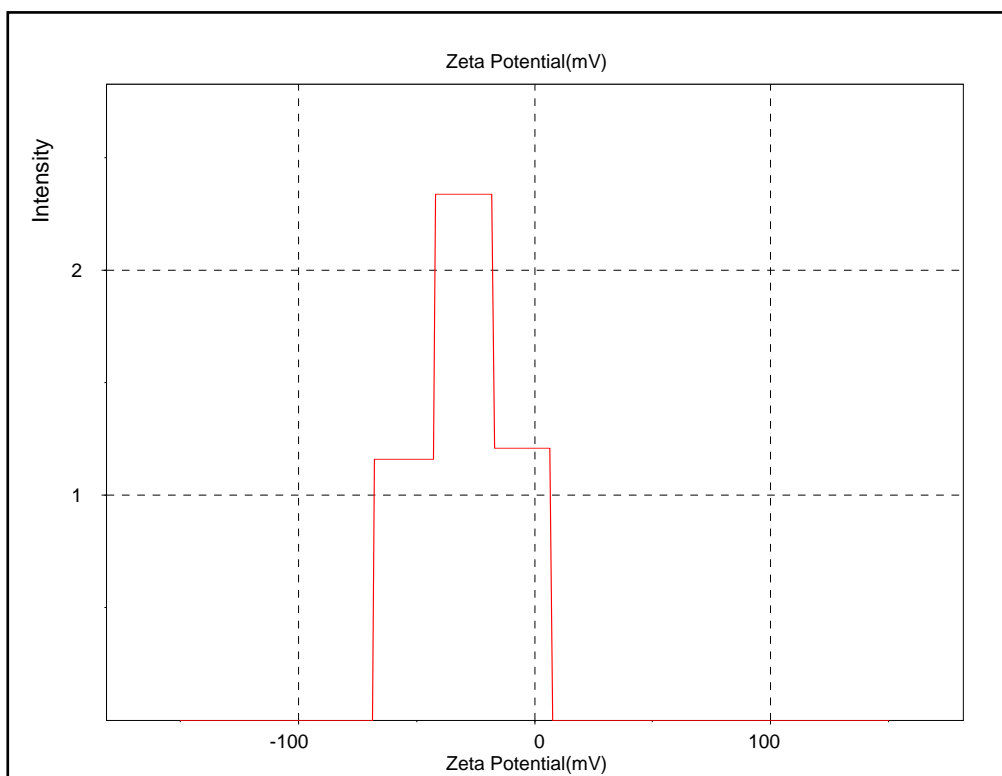
A técnica consiste em sujeitar uma amostra a uma microelectroforese e simultaneamente, determinar o movimento das partículas por “Dynamic Laser Light Scattering”. A amostra é aplicada num pequeno capilar com um eléctrodo em cada extremidade e submetida a um campo eléctrico que implica deslocação das partículas da amostra. A velocidade que as partículas adquirem, para um dado campo eléctrico, é designada por mobilidade electroforética e pode ser determinada para um dado volume de amostra. Assim, as partículas existentes num pequeno volume, que corresponde à zona de cruzamento dos feixes laser, produzem difracção da luz que oscila no tempo de uma forma que dependerá da sua mobilidade. Esta difracção é captada por um detector (fotomultiplicador), e sua intensidade é correlacionável com a mobilidade electroforética.



Esta conversão é realizada por um autocorrelacionador que, por sua vez, envia toda a informação a um computador, com um software específico, para o cálculo do potencial zeta assim como todo o tratamento estatístico dos resultados.

As amostras são preparadas por diluição das formulações num solvente filtrado (NaCl 154 mM) por filtros de porosidade 0,02  $\mu\text{m}$  ou inferior, de modo a obter uma concentração de 3  $\mu\text{mol}$  de lípido/ml de formulação.

Os resultados, impressos num relatório (**Figura III. 10.**), fornecem informações importantes acerca da carga superficial das vesículas, da sua variação em função dos agentes bioactivos incorporados, da sua estabilização (agregação ou fusão) e do seu comportamento *in vivo*.



**Figura III. 10.** - Exemplo de um relatório impresso após a determinação do potencial zeta de uma população lipossomal.

Neste exemplo, o potencial zeta ( $\zeta$  (mV)) dos lipossomas é de  $-29,6 \text{ mV} \pm 8,9$ .

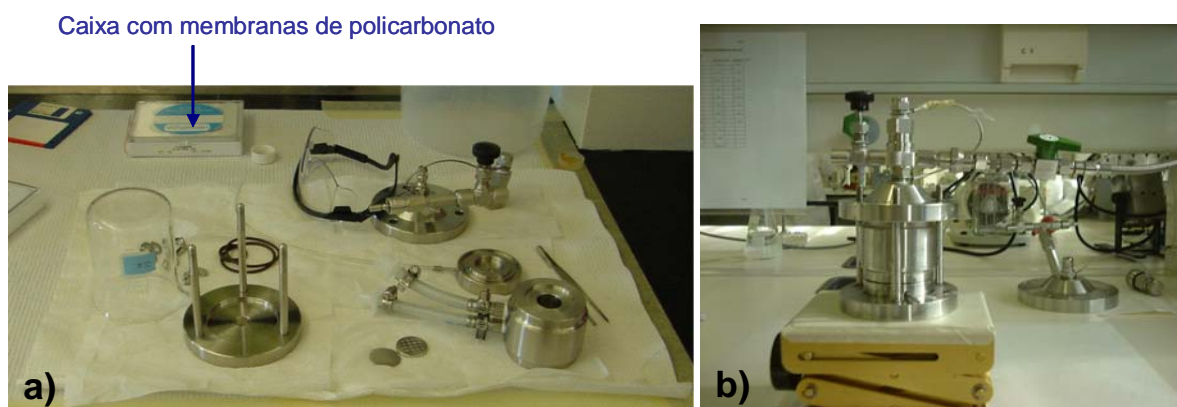
## 2.3 – METODOLOGIAS DE PREPARAÇÃO DE LIPOSSOMAS

Vários tipos de lipossomas (MLV's, SUV's, LUV's, VET's, DRV's, entre outros) podem ser preparados por uma ampla diversidade de métodos, dado os inúmeros mecanismos envolvidos na formação dos lipossomas. Neste trabalho a ORZ incorporada em lipossomas foi preparada utilizando dois métodos diferentes, que irão ser descritos de seguida.

### 2.3.1 – Preparação de VET's com ORZ

A metodologia de preparação de VET's foi já referida na introdução em 3.10 e portanto será apenas descrito sucintamente o procedimento de incorporação de ORZ neste tipo de lipossomas (**Figura III. 12.**).

Os lípidos e a ORZ, numa razão molar de 10:1, foram secos num evaporador rotativo (BUCHI rotavapor RE-111) para evaporação do solvente (clorofórmio) e posteriormente hidratados, com agitação, com uma solução de NaCl 154 mM num volume correspondente a um décimo do volume final. Passado 15 minutos, realizou-se uma segunda fase de hidratação com o mesmo volume de NaCl. O volume final da formulação lipossomal foi completado com a mesma solução (oito décimos do volume final). Estes lipossomas tipo MLV's foram dimensionados e homogeneizados através de extrusão, utilizando para tal um Extruder Lipex Biomembranes, (Vancouver, Canadá) (**Figura III. 11.**). Este processo força, por pressão de azoto, a passagem das formulações lipossomais por membranas de polycarbonato com tamanhos de poro bem definidos até ser atingido o tamanho desejado das vesículas (Nucleopore Filtration Products, Cambridge, E.U.A.).

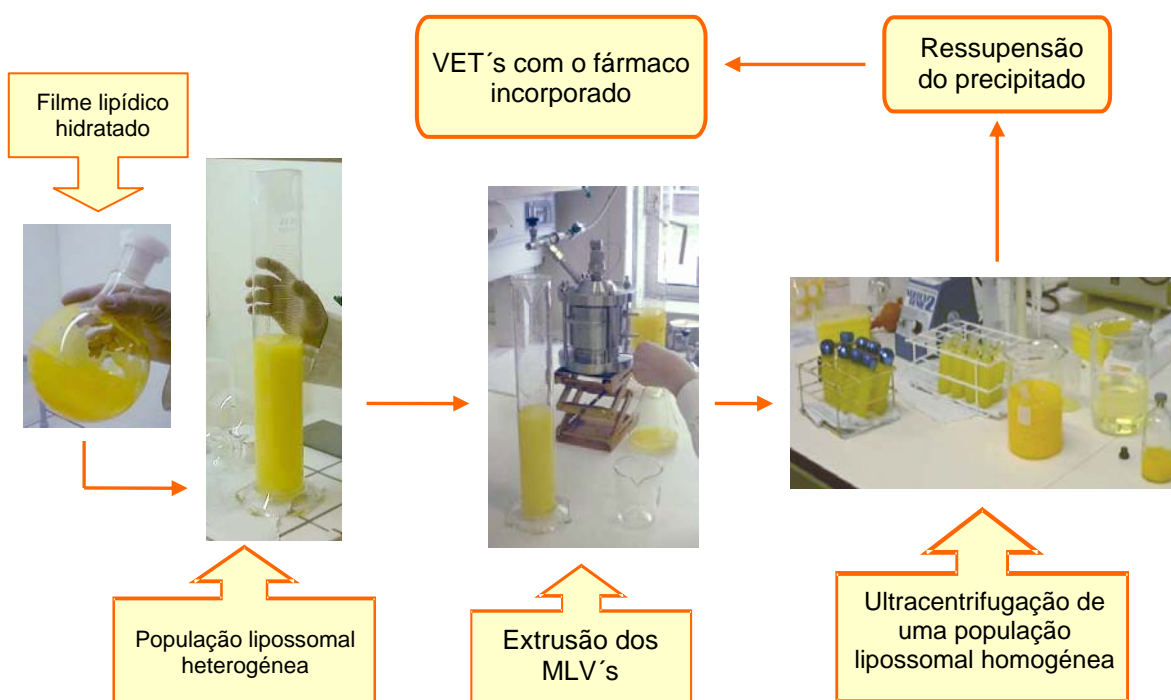


**Figura III. 11.** - a) peças do Extruder. b) disposição de todas as peças para montagem do Extruder Lipex Biomembranes (Vancouver, Canadá).

Normalmente este processo é feito por etapas de filtração através de filtros com diâmetros sucessivamente mais pequenos, por exemplo, 1; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2  $\mu\text{m}$ .

Obteve-se então uma população lipossomal homogénea à qual lhe foi retirado um pequeno volume de amostra para determinações.

De forma a separar a ORZ livre (não incorporada) na superfície dos VET's, da ORZ incorporada na bicamada lipídica, diluiu-se a amostra extrusada 50 vezes em NaCl 154 mM, garantindo a hidrossolubilidade do fármaco (solubilidade da ORZ de 2,5 mg/L), e efectuou-se a ultracentrifugação (Ultracentrifuga – L8-60 M, Beckman Instruments, E.U.A.) a 49 000 rpm (247 130  $xg$ ) num rotor tipo 70Ti (Beckman Instruments, E.U.A.) durante duas horas. Assim, eliminou-se a ORZ que não foi incorporada presente no sobrenadante, obtendo-se um precipitado de ORZ lipossomal. Para finalizar a preparação dos VET's com ORZ, ressuspendeu-se o precipitado em NaCl 154 mM até ao volume final pretendido.



**Figura III. 12.** - Etapas de preparação de VET's.  
Adaptado de Pinhal *et al.* (2005) [217].

### 2.3.2 – Preparação de DRV's com ORZ

O método de preparação de DRV's tem como base a liofilização de uma suspensão de lipossomas (MLV's) e a sua re-hidratação (com água) (**Figura III. 13.**).

A etapa inicial de secagem do filme lipídico é idêntica à do método descrito em 2.3.1. A hidratação deste filme lipídico é também realizada em 3 etapas. No entanto, neste caso, foi necessário a adição de um crioprotector, uma vez que a formulação lipossomal de ORZ foi posteriormente sujeita a uma liofilização. A presença de um crioprotector nas duas primeiras fases de hidratação demonstrou ser essencial para os DRV's terem boas eficácias de incorporação, tal facto pode ser observado nos resultados em 1.2. A hidratação trifásica iniciou-se com trealose 300 mM (1/10 do volume final), seguiu-se de uma segunda hidratação com trealose 300 mM (1/10 do volume final) e NaCl 154 mM (volume restante – 8/10 do volume final) na terceira. Ao filme lipídico hidratado foi retirado uma amostra inicial (efectuou-se o mesmo na preparação dos VET's com ORZ).

A suspensão lipossómica foi transferida do balão para frascos de liofilização que foram congelados a -70°C durante 30-45 minutos. Posteriormente, realizou-se uma liofilização (Liofilizador EDWARDS, Modulyo, Alemanha) durante a noite, ao que se seguiu uma re-hidratação com água desmineralizada. A hidratação dos liofilizados fez-se em duas etapas: inicialmente adicionou-se 1/10 do volume total, agitou-se no vortex e após 15 minutos adicionou-se o restante volume. Nesta etapa do processo foi retirado a amostra liofilizada.

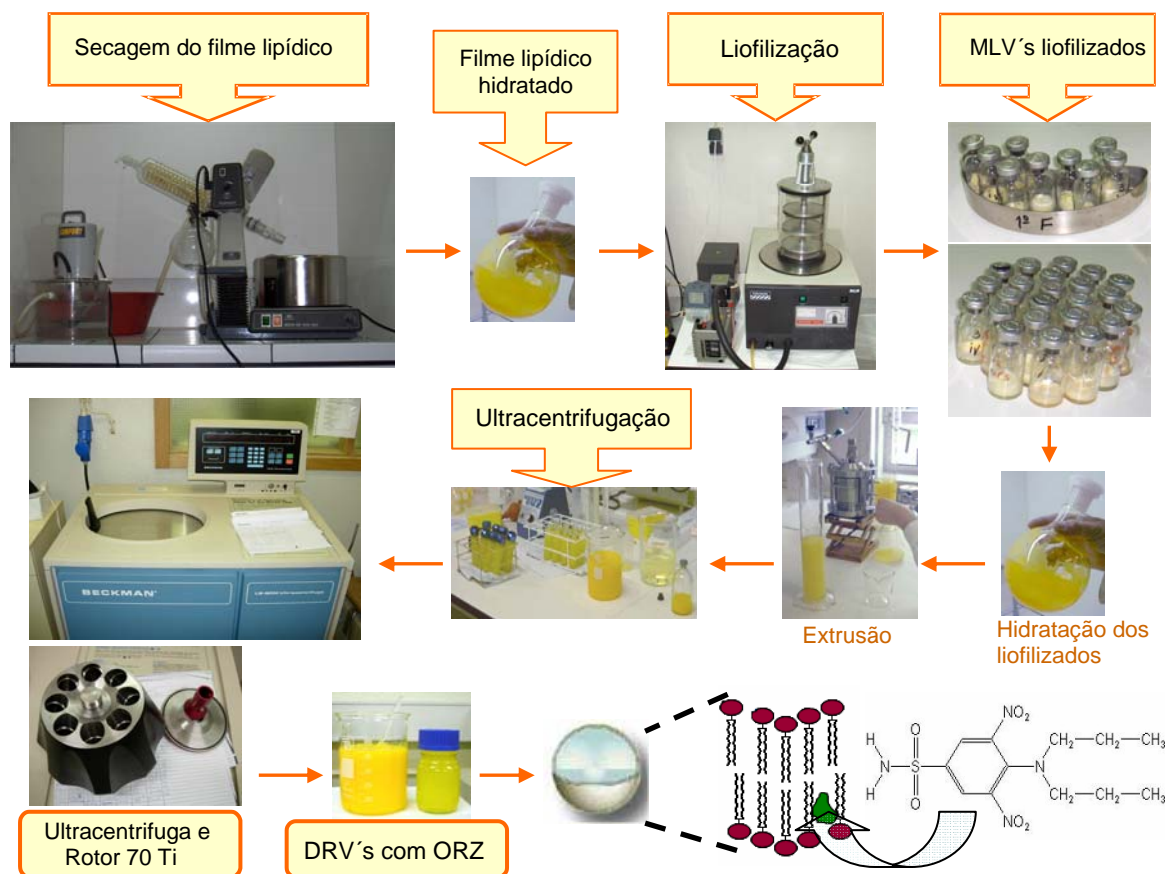
Por fim, efectuaram-se as etapas de extrusão, diluição e ultracentrifugação referenciadas em 2.3.1.

As amostras retiradas serviram para caracterizar a formulação durante as várias fases do processo e são designadas por:

- $A_i$  - amostra inicial após hidratação do filme lipídico;
- $A_{liof}$  – amostra após hidratação dos liofilizados;
- $A_{ext}$  – amostra após extrusão dos lipossomas;
- $A_f$  – amostra final após centrifugação dos lipossomas.

Durante a preparação dos lipossomas utilizou-se uma solução de NaCl a 154 mM e uma de trealose a 300 mM, ambas com uma osmolaridade de 300 mOsm, tendo como finalidade obter formulações lipossomais iso-osmóticas com o soro sanguíneo. Uma vez que as vesículas lipossomais são sensíveis a diferenças de osmolaridade entre o seu

espaço interno e o meio externo, torna-se necessário assegurar que a osmolaridade do seu compartimento interno, seja idêntica à do soro sanguíneo, de modo a que, *in vivo*, mantenham as suas características morfológicas.



**Figura III. 13.** - Etapas de preparação de DRV's com ORZ.

## Análise estatística

Todos os resultados foram submetidos a análise estatística para avaliação da significância das variações, usando o teste de factor simples Anova, para um intervalo de confiança de 95 %.

## 2.4 – DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE DE UMA SUSPENSÃO LIPOSSÓMICA CONTENDO ORIZALINA

Após uma selecção rigorosa das condições mais favoráveis para a incorporação de ORZ em lipossomas, procedeu-se à preparação de DRV's com ORZ, partindo de uma concentração inicial de fármaco de 2  $\mu\text{mol/mL}$  e de uma composição lipídica de PC:PG (4:1), de acordo com a metodologia referenciada em 2.3.2.

As formulações foram caracterizadas quanto às dimensões e polidispersão das vesículas, pelo método descrito em 2.2.3, e quanto aos parâmetros de incorporação, pelos processos referidos em 2.2. As técnicas usadas para o doseamento da ORZ e do lípido foram as descritas em 2.2.1 e 2.2.2, respectivamente.

### 2.4.1 – Estabilidade a 4 °C

O estudo da estabilidade dos lipossomas contendo ORZ, em soro fisiológico, permitiu avaliar a difusão de fármaco para o exterior das vesículas e monitorizar os lipossomas, no que respeita ao diâmetro médio e à homogeneidade das suspensões, durante um período de 11 dias.

Os tempos analisados foram os seguintes: 0, 12, 24, 48, 120 e 264 horas.

O procedimento adoptado consistiu numa diluição prévia (1:1) da suspensão lipossómica, com NaCl 154mM. A suspensão final foi dividida em fracções de 500  $\mu\text{L}$ , rapidamente conservadas no frigorífico a 4 °C. Ao fim dos intervalos de tempo previamente estabelecidos, triplicados de alíquotas foram diluídos 50 vezes e ultracentrifugadas (247 130 xg, 2 horas, 4 °C) de forma a eliminar a ORZ que tenha saído do lipossoma. No final procedeu-se à caracterização das amostras ressuspendidas, realizando-se doseamentos de fármaco, lípido e dimensionamento das vesículas.

### 2.4.2 – Estabilidade a 37 °C

Preparam-se lipossomas do tipo DRV's, com a mesma composição lipídica do ponto anterior. Como o estudo de estabilidade se iniciou na manhã seguinte à preparação dos DRV's, o tempo 0 horas correspondeu a uma dispersão de DRV's conservada no frigorífico durante 12 horas. No dia seguinte à preparação dos DRV's procedeu-se a uma

diluição prévia (1:1) da dispersão lipossômica, com uma solução de BSA a pH 7,4, num tubo Falcon. Esta solução tinha como composição ácido cítrico 10 mM/NaCl 145mM com 2% BSA.

Para o estudo de estabilidade a 37 °C, foram analisadas amostras às 0; 0,5; 4; 8 e 24 horas. Os tempos indicados foram contabilizados desde o instante em que se colocou a suspensão lipossômica com BSA num banho termostatizado a 37 °C. Nesses intervalos de tempo, procedeu-se à colheita de três alíquotas, efectuando-se em cada uma, a determinação de ORZ, lípido e diâmetros. A separação dos lipossomas do meio extralipossômico processou-se por diluição (50 vezes) e ultracentrifugação a 278 317 xg, à temperatura de 4 °C, durante 4 horas e 30 minutos.

Para excluir a existência de ORZ livre co-precipitada com os lipossomas foi feita uma observação ao microscópio das dispersões estudadas. Em tal eventualidade os cristais ou precipitado de ORZ na superfície externa dos lipossomas seriam visíveis e rejeitados por uma centrifugação de bancada a 10 000 xg, durante 10 minutos.

## 2.5 – ESTABELECIMENTO DO MODELO ANIMAL DE LEISHMANIOSE VISCERAL

Durante o desenvolvimento galénico de ORZ lipossomal estabeleceu-se um modelo animal de leishmaniose visceral para avaliação da actividade terapêutica da ORZ, quer na forma lipossomal quer na forma livre.

### 2.4.1 - Animais

Usaram-se 40 murganhos BALB/c macho, com cerca de 5 semanas de idade e pesando cerca de 20g.

Os animais foram adquiridos no Instituto Gulbenkian de Ciência (Fundação Callouste Gulbenkian, Oeiras, Portugal) e, durante o estudo, foram mantidos com água acidificada (pH = 3) e ração (Panlab A04, Portugal), no biotério do Departamento de Biotecnologia do Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação (Lisboa, Portugal).



#### 2.4.2 – Inoculação da estirpe *L. infantum* – MON-1(MCAN/PT/94/IMT 205)

Os animais foram infectados, por via intra peritoneal (i.p.), com 0,1 mL de uma solução de promastigotas a  $1 \times 10^7$ /mL (**Figura III. 14.**). Os promastigotas foram gentilmente cedidos pela Dra. Gabriela Santos Gomes da Unidade de Leishmanioses/Centro de Malária e Outras Doenças Tropicais do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (Lisboa, Portugal).



**Figura III. 14.** - Murganho BALB/c infectado por i.p. com  $1 \times 10^6$  promastigotas.

#### 2.4.3 – Estudos parasitológicos

Neste trabalho foram utilizados dois métodos para a determinação da carga parasitária no baço dos murganhos BALB/c, a impressão em lâmina e a diluição limite, que irão ser descritos de seguida.

Serão também descritos todos os procedimentos efectuados para a detecção dos parasitas pelos dois métodos utilizados.

##### **Método das impressões em lâmina**

Foi preparado e esterilizado com antecedência todo o material necessário (ver **Tabela III. 3.**).



**Tabela III. 3. - Material e reagentes utilizados para o estudo parasitológico.**

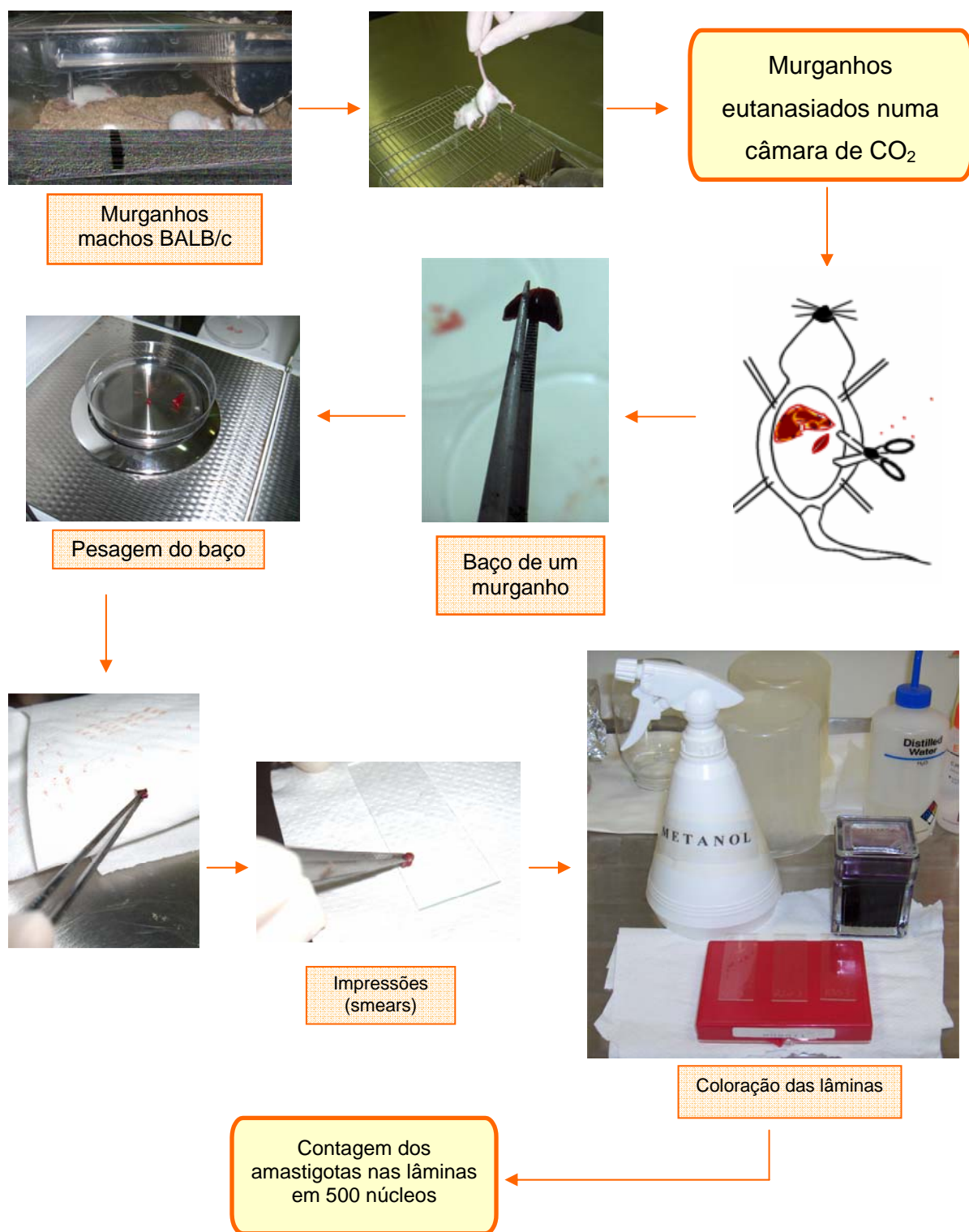
Reagentes	Material	Esterilização em autoclave (121°C durante 60 minutos)
Pulverizador com Etanol a 70 %	Luvas	-
Lixívia	Frasco SCHOTT 250 mL	+
Esguicho com Metanol a 100%	Potters com tampa	+
Giemsa	Pinças largas	+
Soro Fetal Bovino (FBS)	Tesoura	+
Meio Schneider (Gibco BRL)	Bisturi	+
Meio NNN (NOVY, MACNEAL and NICOLLE)	Caixa de lâminas e lamelas	-
Bacto-agar (Difco)	Marcador de vidro	-
NaCl (Merck)	Barquinhos	+
Água desmineralizada	Microplaca de 96 poços	-
Sangue de coelho desfibrinado	Micropipeta muticanal	-
-	Caixa de pontas	+

Em tempos previamente estabelecidos após a infecção, grupos de 3 animais foram eutanasiados com uma pressão baixa de CO<sub>2</sub> (garrafa de CO<sub>2</sub> ligada a uma caixa) de forma a adormecer primeiro e eutanasiar depois (10 a 15 minutos).

Na câmara de fluxo laminar, lavou-se a pele e o abdómen com etanol a 70% e, depois de aberta a cavidade abdominal, removeu-se o baço e pesou-se numa balança analítica (Precisa 205 A SCS, Suíça) (**Figura III. 15.**). De seguida, cortou-se uma pequena extremidade do baço com aproximadamente 0,01g e colocou-se num frasco com meio Schneider contendo 20 % de FBS. Em simultâneo, com a secção transversal cortada imprimiu-se uma lâmina de vidro, por cada animal, com toques suaves. Fizeram-se cerca de 40 impressões (smears) por lâmina com o mínimo de sangue possível. Seguiu-se uma pulverização das lâminas com metanol a 100% para fixar as impressões. Posteriormente, deixaram-se secar e colocaram-se numa câmara contendo uma solução do agente corante Giemsa diluído com água (Giemsa:H<sub>2</sub>O 1:10). A coloração de Giemsa diferencia a morfologia nuclear e citoplasmática do parasita, permitindo a sua detecção.

Passados 45 minutos, procedeu-se a uma lavagem das lâminas com água. As lâminas secas foram então observadas ao microscópio óptico para avaliação da infecção, determinando-se o número de amastigotas no baço pela equação de Stauber [218]:

$$\frac{n^{\circ} \text{ amastigotas}}{n^{\circ} \text{ de núcleos}} \times \text{peso do órgão (mg)} \times (2 \times 10^5) = n^{\circ} \text{ amastigotas / órgão}$$



**Figura III. 15.** - Esquematização das etapas do método de impressões em lâmina.

### **Método de Diluição limite (adaptado de Buffet *et al.* (1995) [219])**

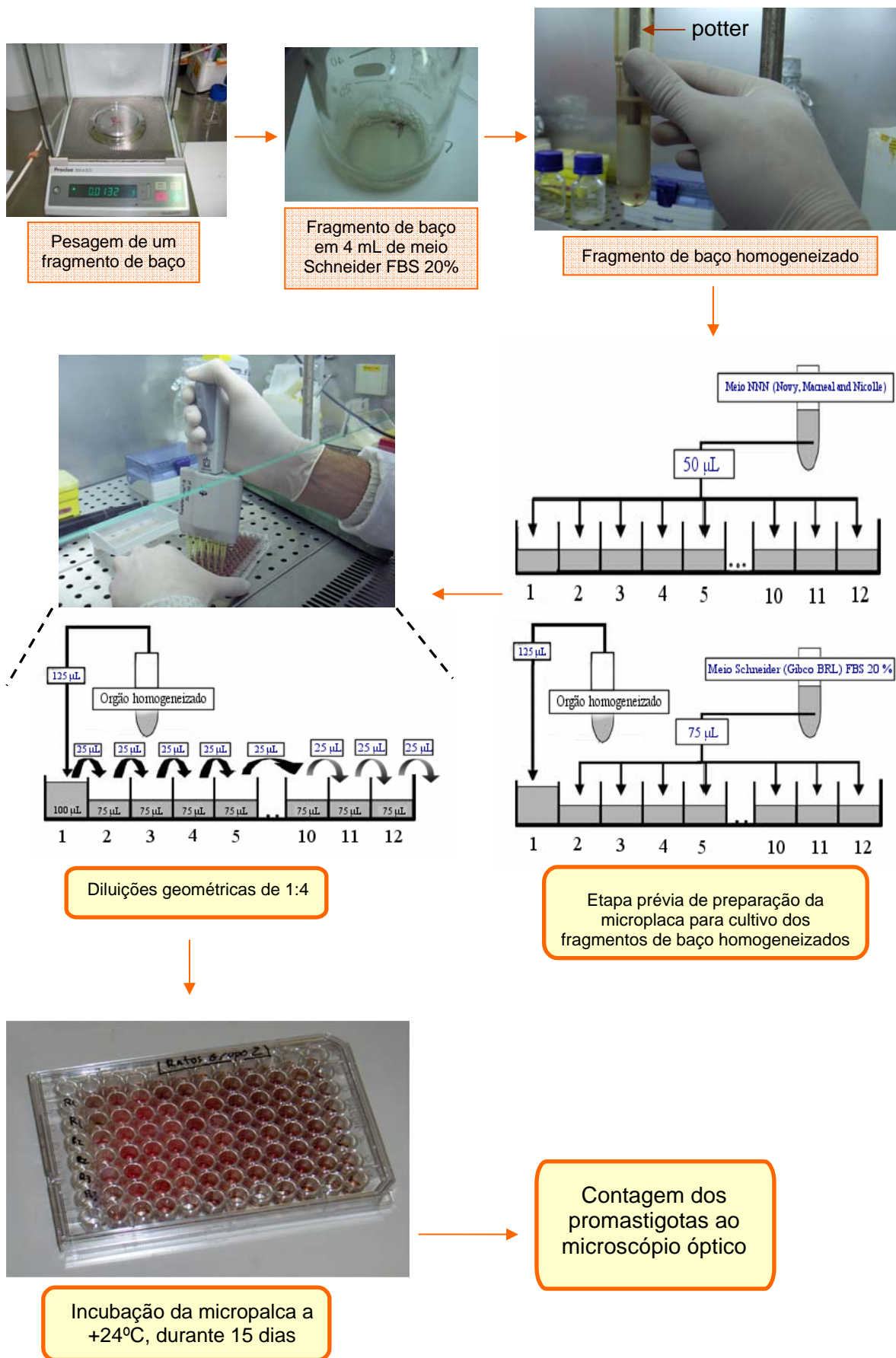
Como confirmação do método de impressões em lâmina, efectuou-se o método de diluição limite que apesar de permitir observar os resultados apenas 15 dias após a colheita do órgão, possui um limite de detecção 50 a 100 vezes superior [219]. Buffet observou em 1995 que em murganhos BALB/c infectados com *L. infantum* a detecção por impressões de baço seria sempre negativa abaixo de  $10^5$  promastigotas por grama de baço e seria sempre positiva acima de  $10^6$  promastigotas por grama. Comparativamente, observou que pelo método de diluição limite a detecção poderia ser possível com  $10^3$  promastigotas por grama de baço. Também realizou uma comparação exaustiva entre os dois métodos, demonstrando terem uma boa correlação (coeficiente de correlação de 0,869) [219].

Para a determinação quantitativa da carga parasitária pelo método de diluição limite, foi necessário a preparação prévia de um meio de cultura para insectos que permita o crescimento dos promastigotas. Assim, foi adicionado 50  $\mu$ L de meio NNN (sólido) a todos os poços de uma microplaca de 96 poços de fundo em U (Nunc). De seguida colocou-se 75  $\mu$ L de meio Schneider FBS 20% (meio de cultura para insectos suplementado com soro fetal bovino) em cada poço da mesma com excepção do primeiro poço de cada linha (**Figura III. 16.**).

Os fragmentos de baço de 0,01g foram homogeneizados com o potter em 4 mL de meio Schneider FBS 20%. Do homogeneizado do órgão foram retirados 125  $\mu$ L e inoculados nos poços da primeira coluna da microplaca, tendo-se efectuado diluições geométricas de 1:4 para os poços seguintes. Para cada amostra de órgão foram efectuadas duas réplicas. Após 15 dias de incubação a +24°C, foi retirado 10  $\mu$ L de cada diluição e observou-se ao microscópio óptico a presença de promastigotas. Por fim, o número de parasitas viáveis por grama de órgão poderá ser calculado (n.º parasitas viáveis /g órgão) com base na seguinte fórmula [219-221]:

$$\frac{\text{recíproco do título da maior diluição com presença de promastigotas}}{\text{peso do fragmento de baço usado (g)}} \times 400$$

Baseando-se na fórmula anterior, determina-se a carga parasitária como sendo o  $\log_{10}$  (nº parasitas viáveis /g órgão).



**Figura III. 16.** - Esquematização das etapas do método de diluição limite.

### **III. – PARTE EXPERIMENTAL**



## 1 – ESQUEMA DO TRABALHO REALIZADO

O trabalho desenvolvido pode ser dividido em três partes:

- I. Desenvolvimento e optimização de métodos apropriados para a incorporação de orizalina em lipossomas. Tal será feito através da incorporação do fármaco em diferentes tipos de lipossomas, fazendo variar diversos parâmetros, como a composição lipídica (nomeadamente pela inclusão de colesterol), o método de preparação e a utilização de crioprotectores.

Será feita a caracterização das formulações sob o ponto de vista físico-químico, nomeadamente em termos do diâmetro médio das vesículas, da composição lipídica, das razões fármaco/lípido iniciais e finais, da concentração intra-lipossomal de fármaco, da eficácia de incorporação e do potencial zeta. Esta caracterização será feita, utilizando os seguintes métodos:

- Método de Rouser para o doseamento de fosfolípidos.
- Método espectrofotométrico para o doseamento de orizalina.

- II. Selecção das formulações mais apropriadas para realização de testes de estabilidade e para futura utilização *in vivo*.

Nesta fase da tese serão realizados estudos de estabilidade, com as formulações desenvolvidas, a 4 °C (condição de armazenamento) e a 37 °C em albumina sérica bovina (BSA) (simulação do comportamento dos lipossomas *in vivo*).

- III. Realização de testes de actividade biológica com uma formulação lipossomal seleccionada nas fases anteriores. Esta fase inclui o estabelecimento e verificação de um modelo animal de leishmaniose visceral, através de um inoculo da estirpe de *Leishmania infantum* MON-1 (MCAN/PT/94/IMT 205) para avaliação da actividade terapêutica da orizalina.

## 2 – MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 – LÍPIDOS E REAGENTES

A orizalina utilizada no trabalho foi adquirida à Supelco, E.U.A. Os fosfolípidos, fosfatidilcolina (PC), fosfatidilglicerol (PG), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), foram adquiridos à Avanti Polar Lipids, Inc. (E.U.A).

O colesterol (Chol), a estearilamina (SA) e a albumina sérica bovina (BSA) foram adquiridos à Sigma - Aldrich Chemie (Alemanha) (**Figura III. 1.**).

Todos os restantes reagentes e solventes utilizados são de grau analítico.



**Figura III. 1.** - Lípidos comerciais utilizados na preparação de lipossomas.

### 2.2 – MÉTODOS DE DOSEAMENTO E PARÂMETROS UTILIZADOS PARA A CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES

De forma a caracterizar as formulações lipossomais foram efectuados doseamentos de fármaco, ou seja de orizalina (ORZ) e de lípido e, foram, também, determinados a carga superficial e o diâmetro das vesículas que serão descritos posteriormente. Com os resultados obtidos, foram calculados vários parâmetros que irão servir para caracterizar estes sistemas do ponto de vista físico-químico.

Os parâmetros utilizados para caracterizar as formulações lipossomais foram: razão fármaco/lípido inicial  $[ORZ/Lip]_{(i)}$  (g/mol), razão fármaco/lípido final  $[ORZ/Lip]_{(f)}$  (g/mol), rendimento em fármaco  $(ORZ_{(f)}/ORZ_{(i)})$  (%), rendimento em lípido  $(Lip_{(f)}/Lip_{(i)})$



(%) e eficácia de incorporação (E.I.) (%) definida como a razão entre a  $[ORZ/Lip]_{(f)}$  e a  $[ORZ/Lip]_{(i)}$  (**Equação III.1.**) [176; 214; 215].

$$E.I = \frac{[ORZ / Lip]_{(f)}}{[ORZ / Lip]_{(i)}} \times 100 \quad \text{(Equação III.1.)}$$

$ORZ_{(i)}$  – orizalina inicial;  $ORZ_{(f)}$  – orizalina retida nos lipossomas;

$Lip_{(i)}$  – lípido inicial;  $Lip_{(f)}$  – lípido após centrifugação organizado em lipossomas

Este parâmetro é a medida da eficiência do sistema inicial,  $(\text{fármaco/lípido})_{(i)}$ , para incorporar o fármaco na forma lipossomal final  $(\text{fármaco/lípido})_{(f)}$ .

### 2.2.1 – Doseamento de Orizalina por um método espectrofotométrico.

O método utilizado para o doseamento de ORZ foi a espectrofotometria directa utilizando para tal um Espectrofotómetro Shimadzu UV-160A (Shimadzu, Japão) com posicionador/termostatizador incorporado (modelo CPS-240A, Shimadzu, Japão) (**Figura III. 2.**).



**Figura III. 2.** - Espectrofotómetro Shimadzu UV-160A com posicionador/termostatizador incorporado modelo CPS-240A (Japão).

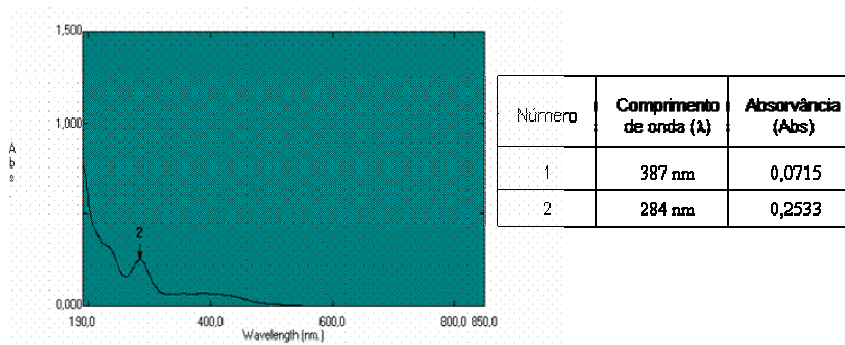
Este método tem como base a absorção específica da ORZ a 284 nm (**Figura III. 3.**). A absorvância é determinada após ruptura dos lipossomas em acetonitrilo e água. A

quantificação de ORZ é realizada por interpolação numa curva de calibração da ORZ em acetonitrilo e água.

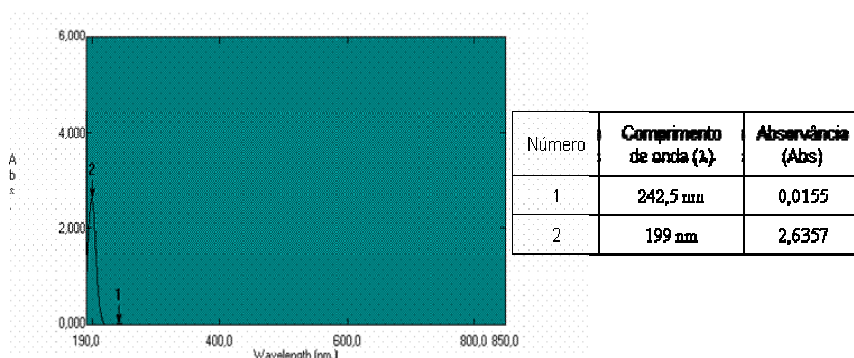
## Protocolo experimental

Numa primeira fase foram realizados vários espectros de ORZ dissolvida em solventes (acetonitrilo e água) de modo a obter-se um comprimento de onda ao qual a orizalina a teria um pico de absorção máximo (**Figura III. 3.** a **Figura III. 5.**). A descrição pormenorizada da montagem da técnica está no ANEXO I.

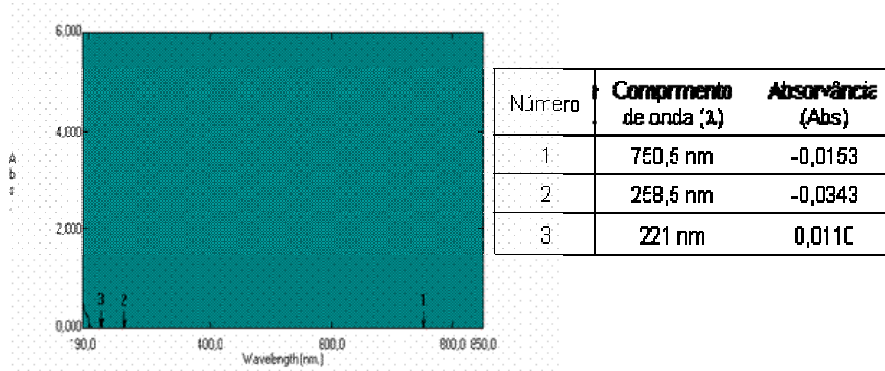
Observou-se que os lípidos (PC e PG) têm um pico de absorção máximos ao comprimento de onda de 199 nm e que a absorção dos solventes utilizados é nula, confirmando que ao comprimento de onda de 284 nm apenas o fármaco é absorvido.



**Figura III. 3.** - Espectro de absorção de orizalina com uma concentração de 5 µg/mL, (concentração teórica de ORZ, após diluição de 1/60) obtido por varrimento de comprimento de onda entre 190 e 850nm.



**Figura III. 4.** - Espectro de absorção de lipossomas vazios de composição lipídica PC:PG (4:1), com uma concentração de 0,17 µmol/mL (concentração dos lipossomas após diluição de 1/60), obtido por varrimento de comprimento de onda entre 190 e 850 nm.



**Figura III. 5.** - Espectro de absorção de uma solução de 20 % (v/v) de acetonitrilo e 80 % (v/v) de água, obtido por varrimento de comprimento de onda entre 190 e 850 nm.

Preparou-se uma solução stock de ORZ a 50 µg/mL em acetonitrilo (100 %) adquirido à Riedel-de Haen (Alemanha). De seguida, procedeu-se a uma diluição de modo a obter uma solução com a razão pretendida (20 por cento de acetonitrilo e 80 por cento de água desmineralizada) (**Equação III.2.**)

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

$$C_f = [P_{\text{máx}}] = \frac{(50 \mu\text{g} / \text{mL}) \times (4 \text{ mL})}{(20 \text{ mL})} \quad (\text{Equação III.2.})$$

$$[P_{\text{máx}}] = 10 \mu\text{g} / \text{mL}$$

$C_i$  – Concentração inicial

$V_i$  – Volume inicial

$C_f$  – Concentração final

$V_f$  – Volume final

Para efectuar a curva de calibração foram preparados 5 mL de soluções de ORZ a 8; 6; 5; 4 e 2 µg/mL a partir da solução de 10 µg/mL (Padrão máximo –  $P_{\text{máx}}$ ), perfazendo-se cada uma destas soluções com uma solução de acetonitrilo e água desmineralizada (Ac/H<sub>2</sub>O) na mesma razão do padrão máximo (20% acetonitrilo + 80% água desmineralizada) (**Tabela III. 1.**)

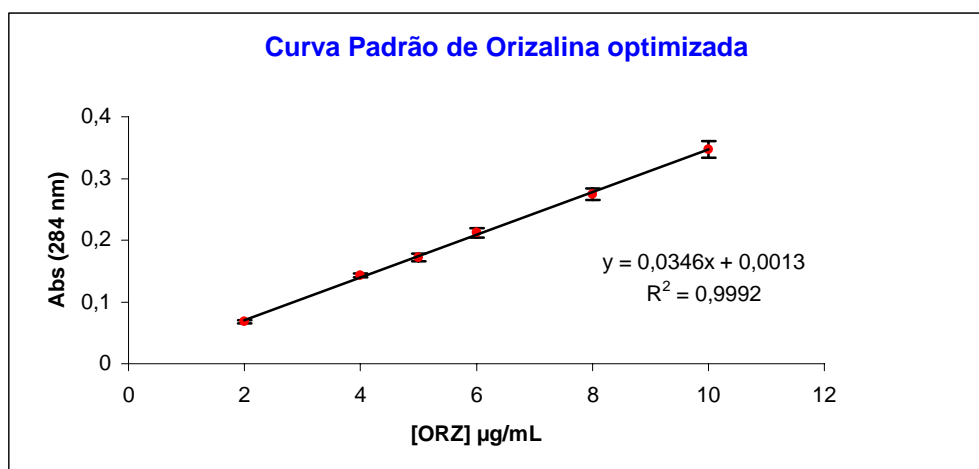
Preparou-se também uma formulação de lipossomas vazios de PC:PG 4:1, com uma concentração de lípido total de 10 µmol/mL, para ser adicionada a todos os pontos da curva de calibração de forma a simular a presença de lipossomas nas amostras reais .

**Tabela III. 1.** - Preparação da curva de calibração para o doseamento de ORZ por espectrofotometria directa.

Padrões	ORZ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Volume inicial (mL)	Solução Ac/H <sub>2</sub> O
P <sub>1</sub>	10	-	-
P <sub>2</sub>	8	4	1
P <sub>3</sub>	6	3	2
P <sub>4</sub>	5	2,5	2,5
P <sub>5</sub>	4	2	3
P <sub>6</sub>	2	1	4

Nota: De modo a otimizar a curva padrão de orizalina foram efectuados triplicados para cada ponto da curva.

Foi então efectuada a leitura da absorvância a 284 nm e registados os valores obtidos para cada Padrão, obtendo-se a recta de calibração (**Figura III. 6.**)



**Figura III. 6.** - Curva de calibração obtida pela leitura de absorvância a 284 nm de várias soluções de ORZ dissolvidas em 20 por cento de acetonitrilo e 80 por cento de água. Os resultados apresentados representam a média e o desvio padrão de 3 experiências independentes.

A preparação das amostras irá depender da concentração de ORZ inicial utilizada na preparação dos lipossomas. Assim, as amostras a serem lidas no espectrofotómetro

foram preparadas por diluição de 20 µL de lipossomas com ORZ em acetonitrilo e água desmineralizada, mantendo a razão acetonitrilo:água de 20:80. Exemplo:

- Amostras preparadas partindo de uma concentração de ORZ(i) de 1 µmol/mL:

(1/60)

**20 µL de Am + 240 µL de Acetonitrilo + 940 µL de H<sub>2</sub>Od**

- Amostras preparadas partindo de uma concentração de ORZ(i) de 2 µmol/mL:

(1/90)

**20 µL de Am + 360 µL de Acetonitrilo + 1 420 µL de H<sub>2</sub>Od**

Am – Amostra

H<sub>2</sub>Od – Água desmineralizada

ORZ(i) – Orizalina inicial

A concentração final das amostras foi obtida pela leitura de triplicados de cada amostra, nas condições referidas acima, por interpolação do valor da mediana na curva de calibração de ORZ.

### 2.2.2 – Doseamento de fosfolípidos pelo método de Rouser

Para quantificar os fosfolípidos que constituem os lipossomas, utilizou-se o método de Rouser [216]. Este método baseia-se na determinação colorimétrica do fosfato inorgânico. Os componentes fosfolipídicos dos lipossomas podem ser determinados após hidrólise dos fosfolípidos com ácido perclórico em fosfatos inorgânicos. O fosfato inorgânico em presença do molibdato de amónio é convertido a ácido fosfomolibdico que é reduzido pela adição de ácido ascórbico, formando um complexo azul após aquecimento. A reacção tem a duração de 5 minutos quando feita num banho termostatzado a 100 °C. O composto corado pode ser determinado por leitura de absorvância no visível, a 797 nm.

## Protocolo experimental

Nesta técnica é usual a preparação prévia da solução padrão de fosfato ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) 0,5 mM e da solução de molibdato de amónio a 1,25% que podem ser guardadas a 4 °C para futuras utilizações. Por outro lado, a solução de ácido ascórbico a 5%, deverá ser preparada em cada doseamento para não haver risco de oxidação pela luz. Para cada doseamento é efectuada uma curva de calibração (ver **Tabela III. 2.**). Para tal colocam-se em tubos devidamente identificados, os volumes de solução padrão ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,5mM) necessários de modo a obter as seguintes quantidades de fosfato inorgânico: 0,02; 0,03; 0,04; 0,05; 0,06 e 0,08  $\mu\text{mol}$ . Acrescentam-se também dois tubos referentes ao branco. Tanto os padrões como o branco irão sofrer o mesmo tratamento a que são sujeitas as amostras e que irá ser descrito posteriormente. Normalmente é necessário efectuar uma diluição prévia das amostras (1:10), para as leituras se encontrarem dentro da curva padrão.

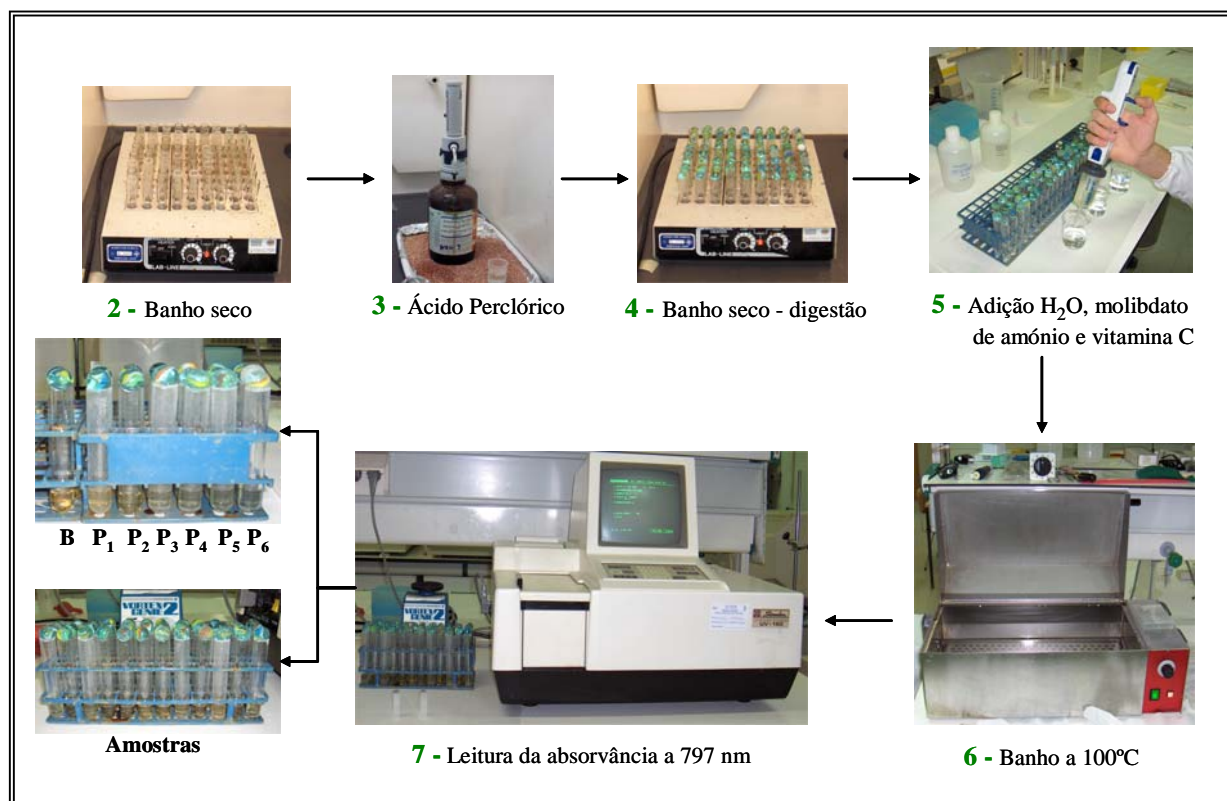
Após realizada a diluição são colocados 50  $\mu\text{L}$  de cada amostra, em triplicado, em tubos também devidamente identificados. Todos os tubos são aquecidos na unidade de aquecimento de tubos (Lab-Line Multi-Block, E.U.A.) até à secura total. De seguida, retiram-se os tubos do aquecimento, deixam-se arrefecer completamente e adicionam-se 300  $\mu\text{L}$  de ácido perclórico 70% (Merck, Alemanha). De seguida, submetem-se os tubos a aquecimento a 170°C durante cerca de 45 minutos ou até se verificar o desaparecimento da coloração. Como já foi referido, é neste passo que ocorre a hidrólise dos fosfolípidos e libertação do fosfato que irá ser doseado.

Removem-se os tubos da unidade de aquecimento e deixam-se arrefecer completamente à temperatura ambiente, adicionando-se seguidamente 1 ml de água, 400 $\mu\text{L}$  de molibdato de amónio (Riedel de Haen, Alemanha) a 1,25%, 400  $\mu\text{L}$  de ácido ascórbico (Riedel de Haen, Alemanha) a 5% e promove-se a homogeneização da mistura. Colocam-se os tubos no banho termostatzado a 100°C (Salvis WKV25, Rotkreuz, Suíça) durante 5 minutos para se dar a reacção. Após arrefecimento total dos tubos é efectuada a leitura da absorvância a 797nm (Espectrofotómetro Shimadzu UV-160, Japão). Esta leitura deverá ser efectuada contra o “branco” (**Figura III. 7.**).

**Tabela III. 2.** - Etapas para a quantificação espectrofotométrica de fosfolípidos constituintes dos lipossomas.

Etapas	Identificação	Branco (n= 2)	Padrões (n = 3)						Amostras (n = 3)		
		nB	nP <sub>1</sub>	nP <sub>2</sub>	nP <sub>3</sub>	nP <sub>4</sub>	nP <sub>5</sub>	nP <sub>6</sub>	nA <sub>i</sub>	nA <sub>ext</sub>	nA <sub>F</sub>
1)	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,5 mM (μL)	-	40	60	80	100	120	160	-	-	-
	Amostras diluídas (1:10) (μL)	-	-	-	-	-	-	-	50	50	50
2)	Lab-Line Multi-Block	Banho seco (evaporar até à secura)									
3)	Ácido perclórico 70% (μL)	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
4)	Lab-Line Multi-Block + Berlindes	Banho seco – digestão (aquecer a 170°C durante 45 min.)									
5)	H <sub>2</sub> O (μL)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
	Molibdato de amónio 1,25%(μL)	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400
	Ácido ascórbico 5% (μL)	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400
6)	Banho a 100°C durante 5 min.										
7)	Abs. 797 nm										

A<sub>i</sub> – Amostra inicial; A<sub>ext</sub> – Amostra extrusada; A<sub>F</sub> – Amostra final.



**Figura III. 7.** - Representação esquemática das etapas de doseamento de fosfolípidos pelo método de Rouser.

### 2.2.3 – Determinação do diâmetro médio dos lipossomas

Os métodos para a determinação do diâmetro médio dos lipossomas para além de variarem na complexidade e no grau de sofisticação, exigem equipamentos de elevado custo. Estes métodos fornecem uma informação precisa acerca do perfil de uma população lipossomal, permitindo analisar as variações de tamanhos dos lipossomas e controlar a qualidade dos mesmos durante, entre e após a sua preparação.

As determinações foram feitas por “Dynamic Laser Light Scattering” no aparelho de determinação de tamanho de partículas Zeta Sizer 1000 HSA (Malvern Instruments, Reino Unido) (**Figura III. 8.**). A técnica consiste em fazer incidir uma radiação laser (hélio e néon ou árgon) numa cuvete com a amostra, a uma dada temperatura e em monitorizar a difracção da luz provocada pelos movimentos das partículas em suspensão. A cuvete de secção transversal quadrada (para medição num ângulo de 90° relativamente ao feixe de laser) é “alojada” numa célula goniométrica termostaticamente controlada. Deste modo, minimizam-se as correntes de convecção aleatória sobrepostas no movimento

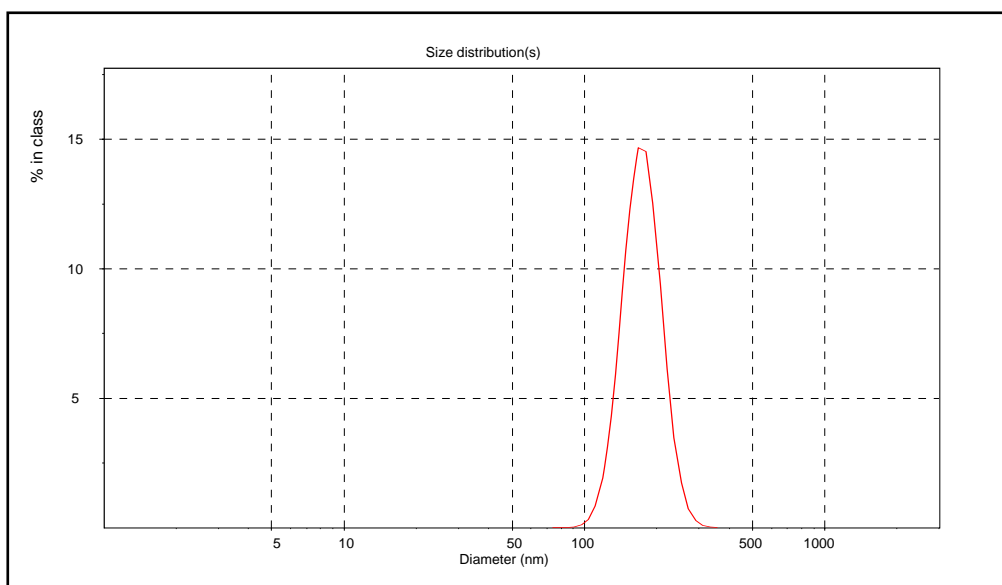


Browniano e qualquer erro potencial devido à variação de viscosidade do fluido. A correlação entre a variação da difracção e a distribuição de tamanhos para a amostra estudada é efectuada por um autocorrelacionador que processa a informação num computador com um software específico para o cálculo do diâmetro das partículas da amostra e tratamento estatístico da mesma. As suspensões de lipossomas são previamente diluídas (1/20) em meio aquoso (NaCl 154 mM) de modo a diminuir a opacidade da suspensão, permitindo um melhor índice de refracção do meio.



**Figura III. 8.** - Aparelho de determinação de tamanho de partículas Zeta Sizer 1000 HSA (Malvern Instruments ,Reino Unido).

Os resultados são impressos num relatório como o que está representado na **Figura III. 9.**, onde se pode retirar informação acerca do número de populações presentes, do diâmetro médio (Zave em nm) e da polidispersão, ou seja a variação em torno do valor para o diâmetro médio obtido (Poly.Index), em que o valor **1** corresponde a uma suspensão totalmente dispersa e o **0** a uma monodispersa.



**Figura III. 9. -** Exemplo de um relatório impresso após a determinação do diâmetro médio de uma população de lipossomas.  
Neste exemplo, o diâmetro médio (Zave(nm)) dos lipossomas é de 172,9 nm e a polidispersão (Poly.Index) é de 0,0339.

#### 2.2.4 – Determinação do potencial zeta dos lipossomas

De modo a caracterizar as vesículas pela sua carga superficial, foi medido o potencial zeta utilizando o aparelho Malvern Zeta Sizer 2000 (Malvern Instruments, Reino Unido).

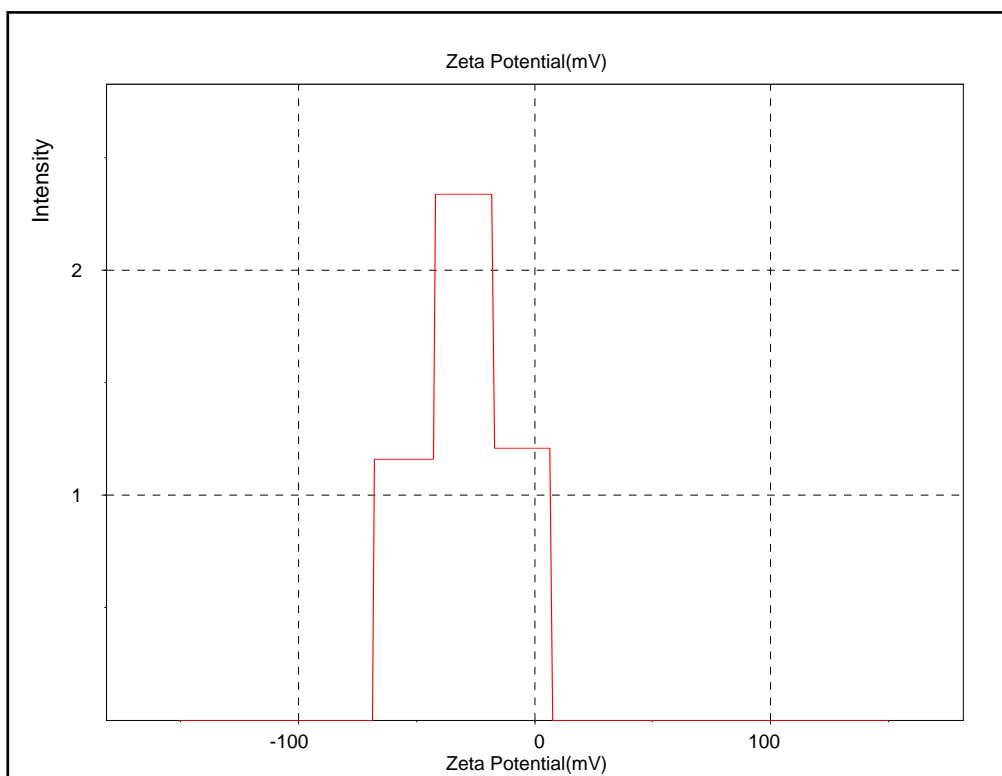
O potencial zeta ( $\zeta$ ), expresso em mV, é definido como a diferença de potencial existente entre o meio de dispersão e a primeira camada de solvente em redor da partícula (também designada plano de corte) e que representa uma esfera imaginária na qual o solvente se desloca acompanhando o movimento da partícula.

A técnica consiste em sujeitar uma amostra a uma microelectroforese e simultaneamente, determinar o movimento das partículas por “Dynamic Laser Light Scattering”. A amostra é aplicada num pequeno capilar com um eléctrodo em cada extremidade e submetida a um campo eléctrico que implica deslocação das partículas da amostra. A velocidade que as partículas adquirem, para um dado campo eléctrico, é designada por mobilidade electroforética e pode ser determinada para um dado volume de amostra. Assim, as partículas existentes num pequeno volume, que corresponde à zona de cruzamento dos feixes laser, produzem difracção da luz que oscila no tempo de uma forma que dependerá da sua mobilidade. Esta difracção é captada por um detector (fotomultiplicador), e sua intensidade é correlacionável com a mobilidade electroforética.

Esta conversão é realizada por um autocorrelacionador que, por sua vez, envia toda a informação a um computador, com um software específico, para o cálculo do potencial zeta assim como todo o tratamento estatístico dos resultados.

As amostras são preparadas por diluição das formulações num solvente filtrado (NaCl 154 mM) por filtros de porosidade 0,02  $\mu\text{m}$  ou inferior, de modo a obter uma concentração de 3  $\mu\text{mol}$  de lípido/ml de formulação.

Os resultados, impressos num relatório (**Figura III. 10.**), fornecem informações importantes acerca da carga superficial das vesículas, da sua variação em função dos agentes bioactivos incorporados, da sua estabilização (agregação ou fusão) e do seu comportamento *in vivo*.



**Figura III. 10.** - Exemplo de um relatório impresso após a determinação do potencial zeta de uma população lipossomal.

Neste exemplo, o potencial zeta ( $\zeta$  (mV)) dos lipossomas é de  $-29,6 \text{ mV} \pm 8,9$ .

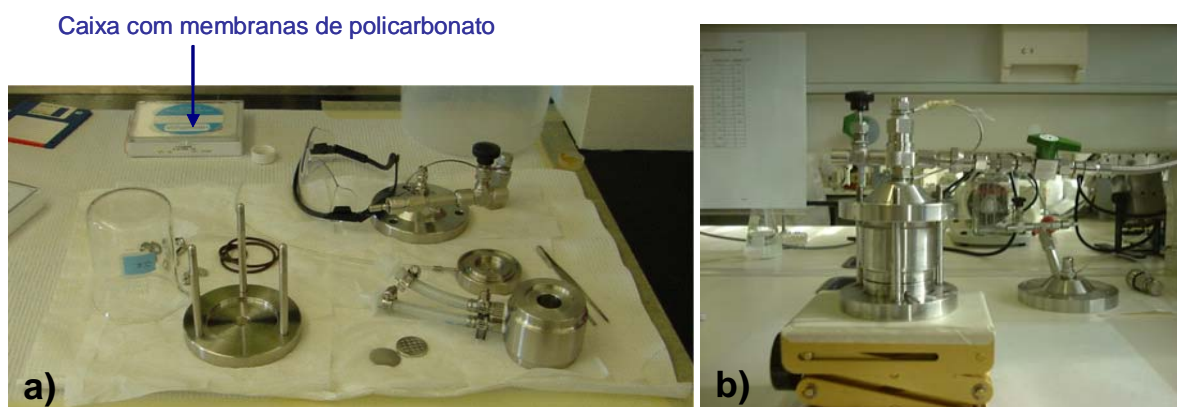
## 2.3 – METODOLOGIAS DE PREPARAÇÃO DE LIPOSSOMAS

Vários tipos de lipossomas (MLV's, SUV's, LUV's, VET's, DRV's, entre outros) podem ser preparados por uma ampla diversidade de métodos, dado os inúmeros mecanismos envolvidos na formação dos lipossomas. Neste trabalho a ORZ incorporada em lipossomas foi preparada utilizando dois métodos diferentes, que irão ser descritos de seguida.

### 2.3.1 – Preparação de VET's com ORZ

A metodologia de preparação de VET's foi já referida na introdução em 3.10 e portanto será apenas descrito sucintamente o procedimento de incorporação de ORZ neste tipo de lipossomas (**Figura III. 12.**).

Os lípidos e a ORZ, numa razão molar de 10:1, foram secos num evaporador rotativo (BUCHI rotavapor RE-111) para evaporação do solvente (clorofórmio) e posteriormente hidratados, com agitação, com uma solução de NaCl 154 mM num volume correspondente a um décimo do volume final. Passado 15 minutos, realizou-se uma segunda fase de hidratação com o mesmo volume de NaCl. O volume final da formulação lipossomal foi completado com a mesma solução (oito décimos do volume final). Estes lipossomas tipo MLV's foram dimensionados e homogeneizados através de extrusão, utilizando para tal um Extruder Lipex Biomembranes, (Vancouver, Canadá) (**Figura III. 11.**). Este processo força, por pressão de azoto, a passagem das formulações lipossomais por membranas de polycarbonato com tamanhos de poro bem definidos até ser atingido o tamanho desejado das vesículas (Nucleopore Filtration Products, Cambridge, E.U.A.).

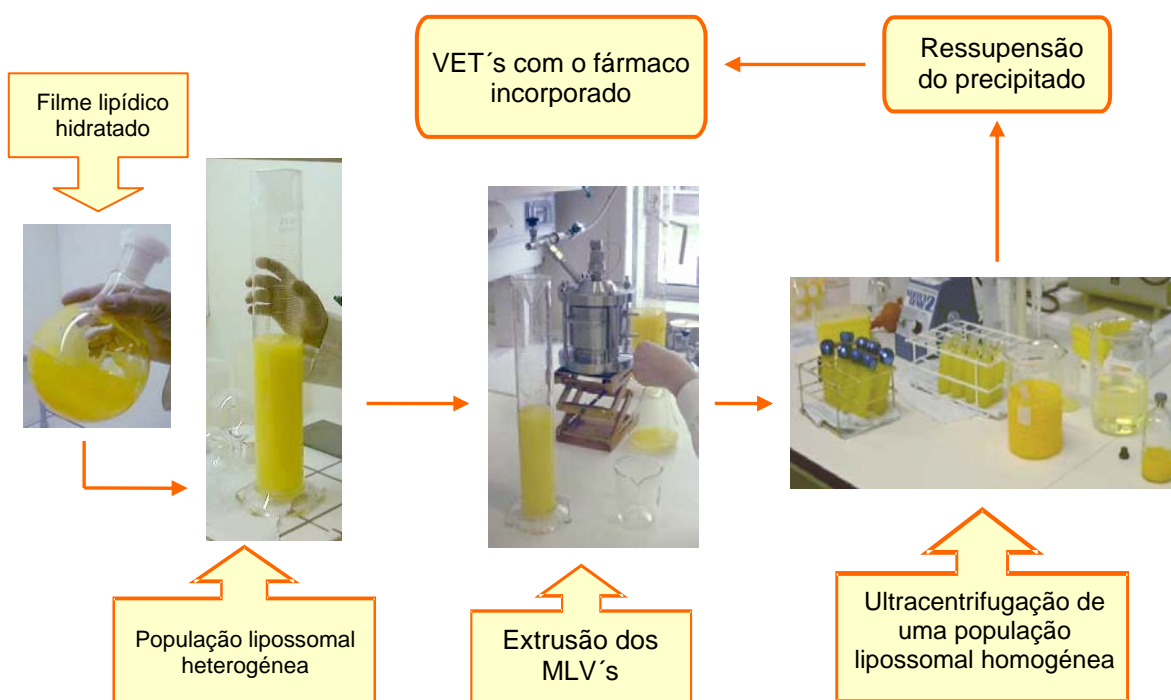


**Figura III. 11.** - a) peças do Extruder. b) disposição de todas as peças para montagem do Extruder Lipex Biomembranes (Vancouver, Canadá).

Normalmente este processo é feito por etapas de filtração através de filtros com diâmetros sucessivamente mais pequenos, por exemplo, 1; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2  $\mu\text{m}$ .

Obteve-se então uma população lipossomal homogénea à qual lhe foi retirado um pequeno volume de amostra para determinações.

De forma a separar a ORZ livre (não incorporada) na superfície dos VET's, da ORZ incorporada na bicamada lipídica, diluiu-se a amostra extrusada 50 vezes em NaCl 154 mM, garantindo a hidrossolubilidade do fármaco (solubilidade da ORZ de 2,5 mg/L), e efectuou-se a ultracentrifugação (Ultracentrifuga – L8-60 M, Beckman Instruments, E.U.A.) a 49 000 rpm (247 130  $xg$ ) num rotor tipo 70Ti (Beckman Instruments, E.U.A.) durante duas horas. Assim, eliminou-se a ORZ que não foi incorporada presente no sobrenadante, obtendo-se um precipitado de ORZ lipossomal. Para finalizar a preparação dos VET's com ORZ, ressuspendeu-se o precipitado em NaCl 154 mM até ao volume final pretendido.



**Figura III. 12.** - Etapas de preparação de VET's.  
Adaptado de Pinhal *et al.* (2005) [217].

### 2.3.2 – Preparação de DRV's com ORZ

O método de preparação de DRV's tem como base a liofilização de uma suspensão de lipossomas (MLV's) e a sua re-hidratação (com água) (**Figura III. 13.**).

A etapa inicial de secagem do filme lipídico é idêntica à do método descrito em 2.3.1. A hidratação deste filme lipídico é também realizada em 3 etapas. No entanto, neste caso, foi necessário a adição de um crioprotector, uma vez que a formulação lipossomal de ORZ foi posteriormente sujeita a uma liofilização. A presença de um crioprotector nas duas primeiras fases de hidratação demonstrou ser essencial para os DRV's terem boas eficácias de incorporação, tal facto pode ser observado nos resultados em 1.2. A hidratação trifásica iniciou-se com trealose 300 mM (1/10 do volume final), seguiu-se de uma segunda hidratação com trealose 300 mM (1/10 do volume final) e NaCl 154 mM (volume restante – 8/10 do volume final) na terceira. Ao filme lipídico hidratado foi retirado uma amostra inicial (efectuou-se o mesmo na preparação dos VET's com ORZ).

A suspensão lipossómica foi transferida do balão para frascos de liofilização que foram congelados a -70°C durante 30-45 minutos. Posteriormente, realizou-se uma liofilização (Liofilizador EDWARDS, Modulyo, Alemanha) durante a noite, ao que se seguiu uma re-hidratação com água desmineralizada. A hidratação dos liofilizados fez-se em duas etapas: inicialmente adicionou-se 1/10 do volume total, agitou-se no vortex e após 15 minutos adicionou-se o restante volume. Nesta etapa do processo foi retirado a amostra liofilizada.

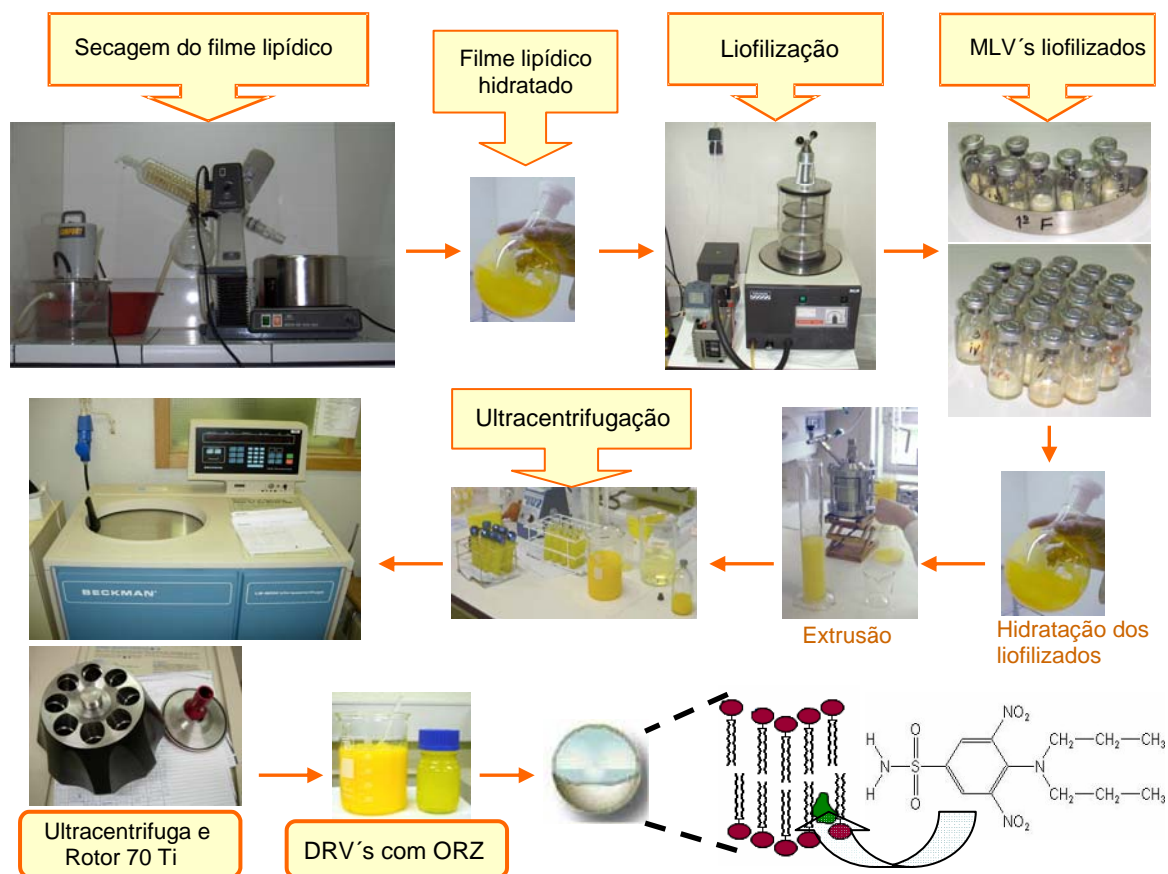
Por fim, efectuaram-se as etapas de extrusão, diluição e ultracentrifugação referenciadas em 2.3.1.

As amostras retiradas serviram para caracterizar a formulação durante as várias fases do processo e são designadas por:

- $A_i$  - amostra inicial após hidratação do filme lipídico;
- $A_{liof}$  – amostra após hidratação dos liofilizados;
- $A_{ext}$  – amostra após extrusão dos lipossomas;
- $A_f$  – amostra final após centrifugação dos lipossomas.

Durante a preparação dos lipossomas utilizou-se uma solução de NaCl a 154 mM e uma de trealose a 300 mM, ambas com uma osmolaridade de 300 mOsm, tendo como finalidade obter formulações lipossomais iso-osmóticas com o soro sanguíneo. Uma vez que as vesículas lipossomais são sensíveis a diferenças de osmolaridade entre o seu

espaço interno e o meio externo, torna-se necessário assegurar que a osmolaridade do seu compartimento interno, seja idêntica à do soro sanguíneo, de modo a que, *in vivo*, mantenham as suas características morfológicas.



**Figura III. 13.** - Etapas de preparação de DRV's com ORZ.

## Análise estatística

Todos os resultados foram submetidos a análise estatística para avaliação da significância das variações, usando o teste de factor simples Anova, para um intervalo de confiança de 95 %.



## 2.4 – DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE DE UMA SUSPENSÃO LIPOSSÓMICA CONTENDO ORIZALINA

Após uma selecção rigorosa das condições mais favoráveis para a incorporação de ORZ em lipossomas, procedeu-se à preparação de DRV's com ORZ, partindo de uma concentração inicial de fármaco de 2  $\mu\text{mol/mL}$  e de uma composição lipídica de PC:PG (4:1), de acordo com a metodologia referenciada em 2.3.2.

As formulações foram caracterizadas quanto às dimensões e polidispersão das vesículas, pelo método descrito em 2.2.3, e quanto aos parâmetros de incorporação, pelos processos referidos em 2.2. As técnicas usadas para o doseamento da ORZ e do lípido foram as descritas em 2.2.1 e 2.2.2, respectivamente.

### 2.4.1 – Estabilidade a 4 °C

O estudo da estabilidade dos lipossomas contendo ORZ, em soro fisiológico, permitiu avaliar a difusão de fármaco para o exterior das vesículas e monitorizar os lipossomas, no que respeita ao diâmetro médio e à homogeneidade das suspensões, durante um período de 11 dias.

Os tempos analisados foram os seguintes: 0, 12, 24, 48, 120 e 264 horas.

O procedimento adoptado consistiu numa diluição prévia (1:1) da suspensão lipossómica, com NaCl 154mM. A suspensão final foi dividida em fracções de 500  $\mu\text{L}$ , rapidamente conservadas no frigorífico a 4 °C. Ao fim dos intervalos de tempo previamente estabelecidos, triplicados de alíquotas foram diluídos 50 vezes e ultracentrifugadas (247 130 xg, 2 horas, 4 °C) de forma a eliminar a ORZ que tenha saído do lipossoma. No final procedeu-se à caracterização das amostras ressuspensas, realizando-se doseamentos de fármaco, lípido e dimensionamento das vesículas.

### 2.4.2 – Estabilidade a 37 °C

Preparam-se lipossomas do tipo DRV's, com a mesma composição lipídica do ponto anterior. Como o estudo de estabilidade se iniciou na manhã seguinte à preparação dos DRV's, o tempo 0 horas correspondeu a uma dispersão de DRV's conservada no frigorífico durante 12 horas. No dia seguinte à preparação dos DRV's procedeu-se a uma



diluição prévia (1:1) da dispersão lipossômica, com uma solução de BSA a pH 7,4, num tubo Falcon. Esta solução tinha como composição ácido cítrico 10 mM/NaCl 145mM com 2% BSA.

Para o estudo de estabilidade a 37 °C, foram analisadas amostras às 0; 0,5; 4; 8 e 24 horas. Os tempos indicados foram contabilizados desde o instante em que se colocou a suspensão lipossômica com BSA num banho termostatizado a 37 °C. Nesses intervalos de tempo, procedeu-se à colheita de três alíquotas, efectuando-se em cada uma, a determinação de ORZ, lípido e diâmetros. A separação dos lipossomas do meio extralipossômico processou-se por diluição (50 vezes) e ultracentrifugação a 278 317 xg, à temperatura de 4 °C, durante 4 horas e 30 minutos.

Para excluir a existência de ORZ livre co-precipitada com os lipossomas foi feita uma observação ao microscópio das dispersões estudadas. Em tal eventualidade os cristais ou precipitado de ORZ na superfície externa dos lipossomas seriam visíveis e rejeitados por uma centrifugação de bancada a 10 000 xg, durante 10 minutos.

## 2.5 – ESTABELECIMENTO DO MODELO ANIMAL DE LEISHMANIOSE VISCERAL

Durante o desenvolvimento galénico de ORZ lipossomal estabeleceu-se um modelo animal de leishmaniose visceral para avaliação da actividade terapêutica da ORZ, quer na forma lipossomal quer na forma livre.

### 2.4.1 - Animais

Usaram-se 40 murganhos BALB/c macho, com cerca de 5 semanas de idade e pesando cerca de 20g.

Os animais foram adquiridos no Instituto Gulbenkian de Ciência (Fundação Callouste Gulbenkian, Oeiras, Portugal) e, durante o estudo, foram mantidos com água acidificada (pH = 3) e ração (Panlab A04, Portugal), no biotério do Departamento de Biotecnologia do Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação (Lisboa, Portugal).

#### 2.4.2 – Inoculação da estirpe *L. infantum* – MON-1(MCAN/PT/94/IMT 205)

Os animais foram infectados, por via intra peritoneal (i.p.), com 0,1 mL de uma solução de promastigotas a  $1 \times 10^7$ /mL (**Figura III. 14.**). Os promastigotas foram gentilmente cedidos pela Dra. Gabriela Santos Gomes da Unidade de Leishmanioses/Centro de Malária e Outras Doenças Tropicais do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (Lisboa, Portugal).



**Figura III. 14.** - Murganho BALB/c infectado por i.p. com  $1 \times 10^6$  promastigotas.

#### 2.4.3 – Estudos parasitológicos

Neste trabalho foram utilizados dois métodos para a determinação da carga parasitária no baço dos murganhos BALB/c, a impressão em lâmina e a diluição limite, que irão ser descritos de seguida.

Serão também descritos todos os procedimentos efectuados para a detecção dos parasitas pelos dois métodos utilizados.

##### **Método das impressões em lâmina**

Foi preparado e esterilizado com antecedência todo o material necessário (ver **Tabela III. 3.**).

**Tabela III. 3. -** Material e reagentes utilizados para o estudo parasitológico.

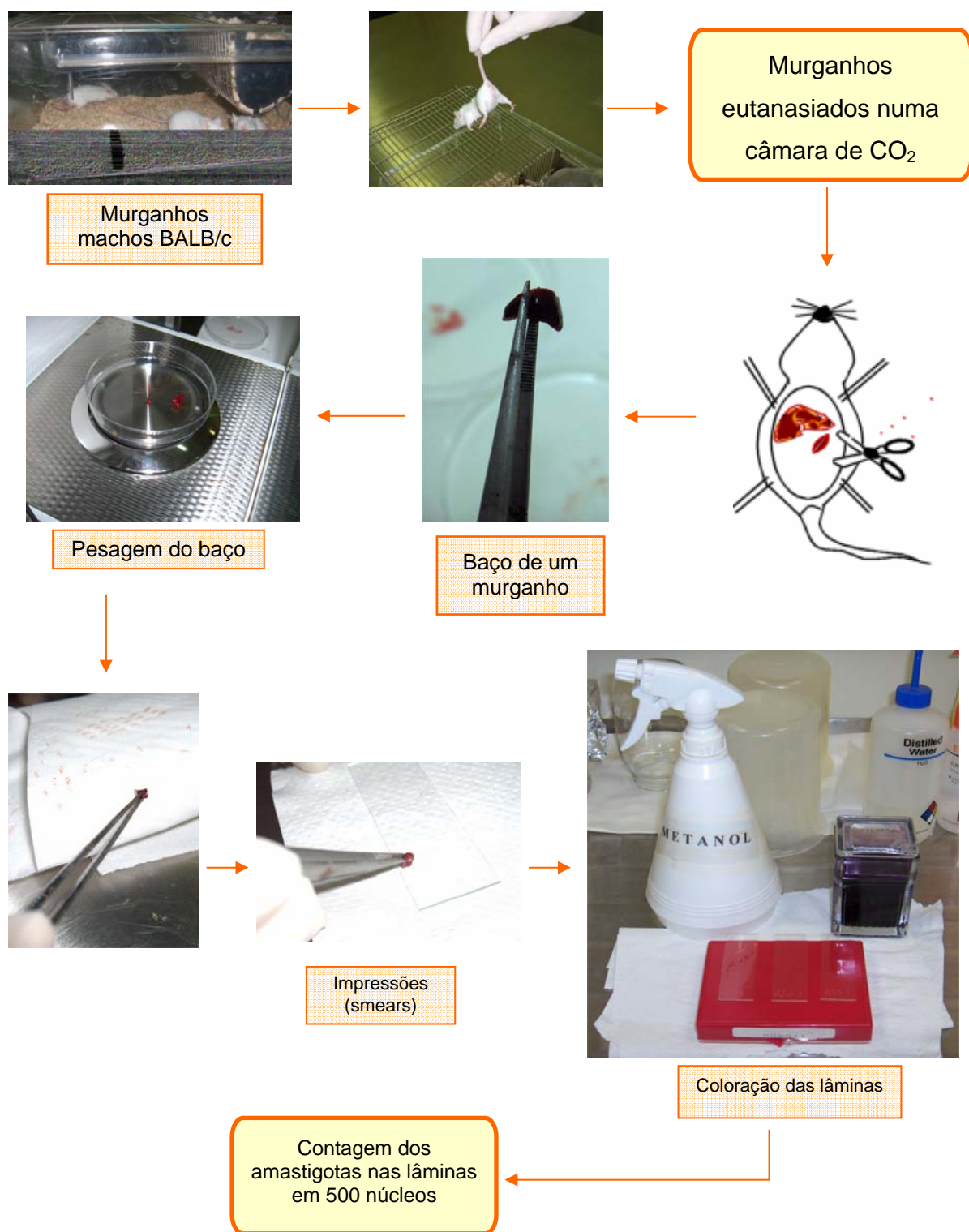
Reagentes	Material	Esterilização em autoclave (121°C durante 60 minutos)
Pulverizador com Etanol a 70 %	Luvas	-
Lixívia	Frasco SCHOTT 250 mL	+
Esguicho com Metanol a 100%	Potters com tampa	+
Giemsa	Pinças largas	+
Soro Fetal Bovino (FBS)	Tesoura	+
Meio Schneider (Gibco BRL)	Bisturi	+
Meio NNN (NOVY, MACNEAL and NICOLLE)	Caixa de lâminas e lamelas	-
Bacto-agar (Difco)	Marcador de vidro	-
NaCl (Merck)	Barquinhos	+
Água desmineralizada	Microplaca de 96 poços	-
Sangue de coelho desfibrinado	Micropipeta muticanal	-
-	Caixa de pontas	+

Em tempos previamente estabelecidos após a infecção, grupos de 3 animais foram eutanasiados com uma pressão baixa de CO<sub>2</sub> (garrafa de CO<sub>2</sub> ligada a uma caixa) de forma a adormecer primeiro e eutanasiar depois (10 a 15 minutos).

Na câmara de fluxo laminar, lavou-se a pele e o abdómen com etanol a 70% e, depois de aberta a cavidade abdominal, removeu-se o baço e pesou-se numa balança analítica (Precisa 205 A SCS, Suíça) (**Figura III. 15.**). De seguida, cortou-se uma pequena extremidade do baço com aproximadamente 0,01g e colocou-se num frasco com meio Schneider contendo 20 % de FBS. Em simultâneo, com a secção transversal cortada imprimiu-se uma lâmina de vidro, por cada animal, com toques suaves. Fizeram-se cerca de 40 impressões (smears) por lâmina com o mínimo de sangue possível. Seguiu-se uma pulverização das lâminas com metanol a 100% para fixar as impressões. Posteriormente, deixaram-se secar e colocaram-se numa câmara contendo uma solução do agente corante Giemsa diluído com água (Giemsa:H<sub>2</sub>O 1:10). A coloração de Giemsa diferencia a morfologia nuclear e citoplasmática do parasita, permitindo a sua detecção.

Passados 45 minutos, procedeu-se a uma lavagem das lâminas com água. As lâminas secas foram então observadas ao microscópio óptico para avaliação da infecção, determinando-se o número de amastigotas no baço pela equação de Stauber [218]:

$$\frac{n^{\circ} \text{ amastigotas}}{n^{\circ} \text{ de núcleos}} \times \text{peso do órgão (mg)} \times (2 \times 10^5) = n^{\circ} \text{ amastigotas / órgão}$$



**Figura III. 15.** - Esquematização das etapas do método de impressões em lâmina.

### **Método de Diluição limite (adaptado de Buffet *et al.* (1995) [219])**

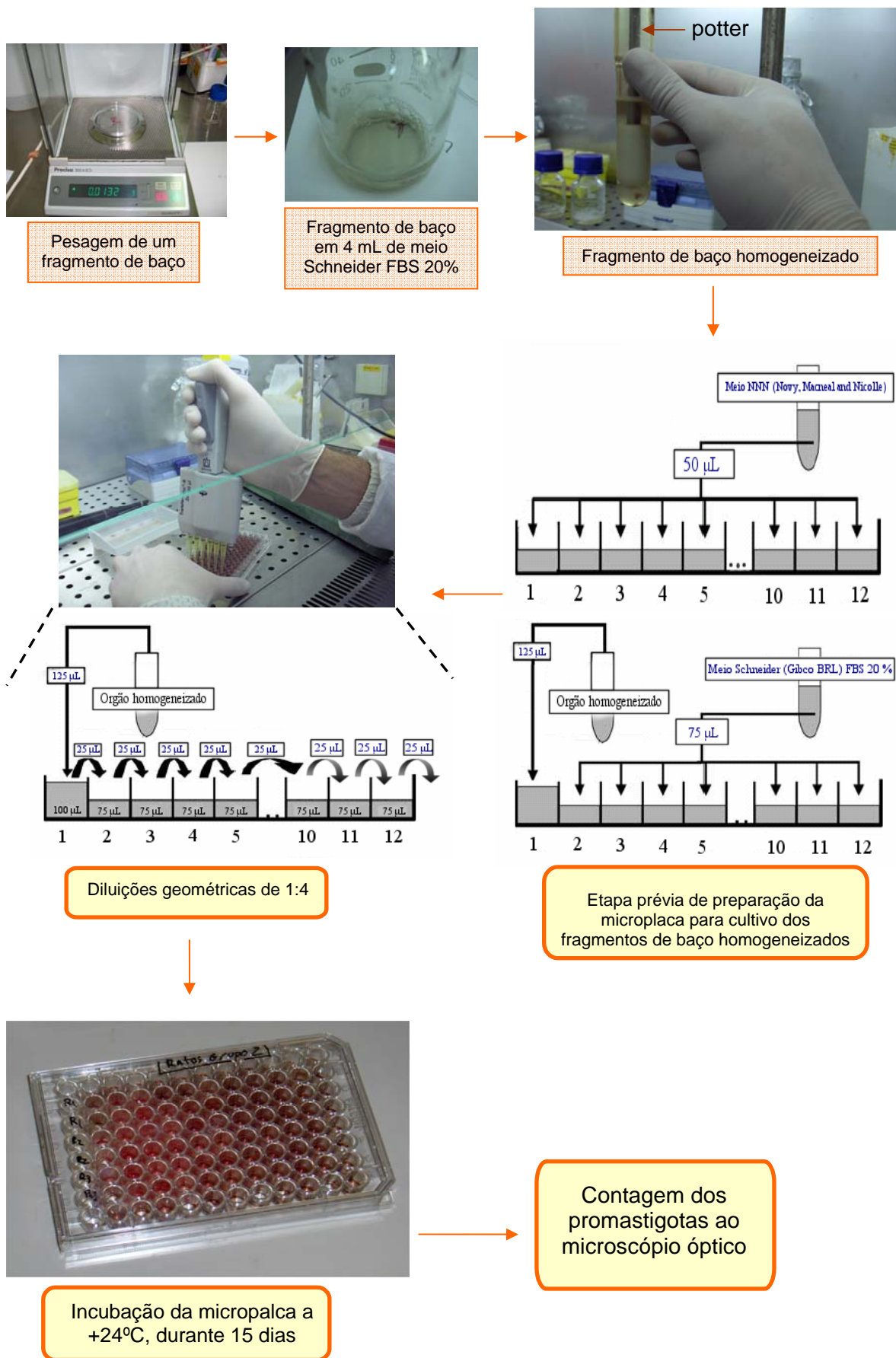
Como confirmação do método de impressões em lâmina, efectuou-se o método de diluição limite que apesar de permitir observar os resultados apenas 15 dias após a colheita do órgão, possui um limite de detecção 50 a 100 vezes superior [219]. Buffet observou em 1995 que em murganhos BALB/c infectados com *L. infantum* a detecção por impressões de baço seria sempre negativa abaixo de  $10^5$  promastigotas por grama de baço e seria sempre positiva acima de  $10^6$  promastigotas por grama. Comparativamente, observou que pelo método de diluição limite a detecção poderia ser possível com  $10^3$  promastigotas por grama de baço. Também realizou uma comparação exaustiva entre os dois métodos, demonstrando terem uma boa correlação (coeficiente de correlação de 0,869) [219].

Para a determinação quantitativa da carga parasitária pelo método de diluição limite, foi necessário a preparação prévia de um meio de cultura para insectos que permita o crescimento dos promastigotas. Assim, foi adicionado 50  $\mu$ L de meio NNN (sólido) a todos os poços de uma microplaca de 96 poços de fundo em U (Nunc). De seguida colocou-se 75  $\mu$ L de meio Schneider FBS 20% (meio de cultura para insectos suplementado com soro fetal bovino) em cada poço da mesma com excepção do primeiro poço de cada linha (**Figura III. 16.**).

Os fragmentos de baço de 0,01g foram homogeneizados com o potter em 4 mL de meio Schneider FBS 20%. Do homogeneizado do órgão foram retirados 125  $\mu$ L e inoculados nos poços da primeira coluna da microplaca, tendo-se efectuado diluições geométricas de 1:4 para os poços seguintes. Para cada amostra de órgão foram efectuadas duas réplicas. Após 15 dias de incubação a +24°C, foi retirado 10  $\mu$ L de cada diluição e observou-se ao microscópio óptico a presença de promastigotas. Por fim, o número de parasitas viáveis por grama de órgão poderá ser calculado (n.º parasitas viáveis /g órgão) com base na seguinte fórmula [219-221]:

$$\frac{\text{recíproco do título da maior diluição com presença de promastigotas}}{\text{peso do fragmento de baço usado (g)}} \times 400$$

Baseando-se na fórmula anterior, determina-se a carga parasitária como sendo o  $\log_{10}$  (nº parasitas viáveis /g órgão).



**Figura III. 16. -** Esquemática das etapas do método de diluição limite.

## **IV. – RESULTADOS E DISCUSSÃO**





# 1 – ESTUDO DOS FACTORES DETERMINANTES PARA A INCORPORAÇÃO DA ORIZALINA EM LIPOSSOMAS

## 1.1 – COMPOSIÇÃO LIPÍDICA

Como já foi referido na introdução, os lípidos possuem propriedades físico-químicas que são determinantes para a formação dos lipossomas e a imobilização de agentes bioactivos nestes sistemas. Com o objectivo de otimizar a incorporação de orizalina (ORZ), foram testadas diversas composições lipídicas. Dado a ORZ e a trifluralina (TFL) ( $\alpha,\alpha,\alpha$ -trifluoro-2,6-dinitro-N,N-dipropil-p-toluidina) serem dinitroanilinas com propriedades físico-químicas bastante semelhantes, o estudo da composição lipídica mais apropriada para a incorporação de ORZ, limitou-se aos lípidos já seleccionados para a TFL, baseados nos melhores resultados de incorporação em lipossomas [222; 223].

Prepararam-se lipossomas do tipo VET's de diferentes composições lipídicas, usando-se uma concentração de lípido total de 10  $\mu\text{mol/mL}$  e uma razão molar inicial ORZ/lípido de 1:10. Como solução aquosa de hidratação foi utilizado o cloreto de sódio (154 mM).

A **Tabela IV. 1.** apresenta os resultados correspondentes ao estudo do efeito da composição lipídica nos diversos parâmetros de incorporação. Foram utilizados lípidos de  $T_f$  baixa, com carga total negativa (F1 e F2), neutra (F3), positiva (F4) e misturas com colesterol (F3 e F4). Observa-se que a eficácia de incorporação e o rendimento do processo (relativamente ao fármaco) são altamente dependentes da composição lipídica, variando de 59-94 % e de 48-79 %, respectivamente. Pelo contrário, o rendimento do processo referente ao lípido é pouco dependente deste factor, variando nos casos estudados, entre cerca de 78 a 88 %. A presença de Chol e de lípidos electricamente carregados influencia marcadamente os parâmetros referidos. Assim, a inclusão de Chol em lipossomas constituídos por PC diminui a capacidade de incorporação da ORZ (F3), obtendo-se menores parâmetros de incorporação. Tal poderá dever-se à estrutura molecular do Chol que orienta a sua porção hidrófoba na matriz lipídica dos lipossomas, competindo directamente com a ORZ, que pela mesma razão ocupa o mesmo local na bicamada. Em contrapartida, esta baixa eficiência de incorporação pode ser superada pela inclusão de um lípido com carga eléctrica positiva aumentando de 48 para 64 % o rendimento e de 59 para 83 % a E.I. (F4 versus F3). Os lipossomas carregados

negativamente (F1 e F2) apresentam uma capacidade de incorporação de ORZ superior à dos lipossomas positivos (F4) e neutros (F3). A carga dos lipossomas foi confirmada pela determinação do potencial zeta (**Tabela IV. 2.**) em que claramente os lípidos contendo PG têm potencial zeta negativo (entre -30 a -40 mV), os neutros potencial zeta cerca de zero e os positivos (F4) potencial zeta +15 mV.

Em conclusão, a eficácia de incorporação é marcadamente dependente da composição lipídica dos lipossomas e da sua carga eléctrica. O facto do potencial zeta ser concordante com a carga do lípido indica que a ORZ não interfere significativamente na carga superficial das vesículas.

**Tabela IV. 1. -** Efeito da composição lipídica nos parâmetros de incorporação de lipossomas (VET's) contendo ORZ <sup>(1)</sup>

Formulação (Fx)	Composição lipídica (razão molar)	Rendimento (η) (%)		[ORZ/Lip](i) (g/mol)	[ORZ/Lip](f) (g/mol)	E.I. (%)
		ORZ	Lípido			
F1	DOPC:DOPG <sup>(2)</sup> (7:3)	73,7	78,9	47,8	44,7	93,5
F2	PC:PG (4:1)	78,9 ± 1,9	87,5 ± 9,3	50,8 ± 5,9	44,4 ± 1,5	88,2 ± 7,2
F3	PC:Chol (10:1)	48,0 ± 4,3	81,4 ± 7,3	77,2 ± 6,6	45,9 ± 7,3	59,1 ± 4,7
F4	PC:Chol:SA (10:1:1)	64,4 ± 6,8	77,6 ± 9,9	55,6 ± 6,9	46,1 ± 4,7	83,2 ± 1,9

Com excepção da formulação 1, cada valor representa a média ± desvio padrão correspondentes a triplicados.

[ORZ/Lip](i): razão inicial fármaco/lípido; [ORZ/Lip](f): razão final fármaco/lípido;

E.I.: eficácia de incorporação; Fx: formulação identificada com o número "x", x = 1, 2, 3 ou 4.

<sup>(1)</sup> Concentração inicial de lípido total: 10 µmol/mL. Razão molar inicial ORZ/lípido: 1:10.

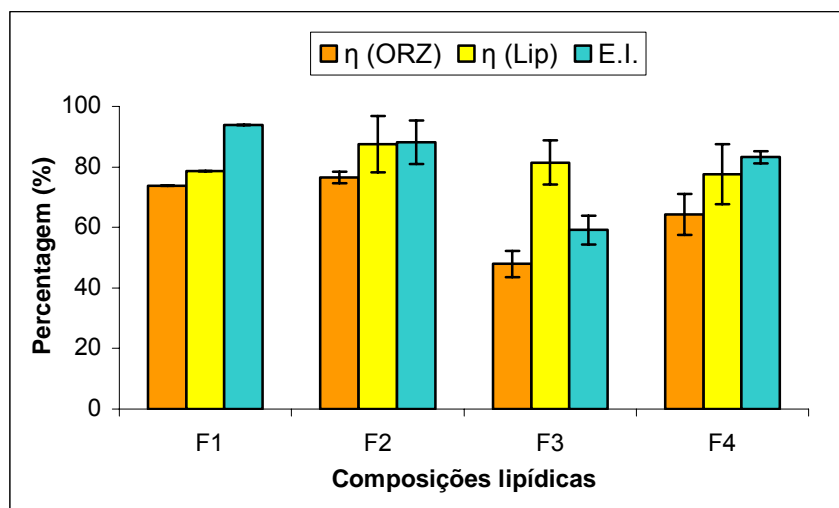
Meio de hidratação: NaCl 154 mM.

<sup>(2)</sup> Formulação preparada uma única vez devido à falta de reagente e ao seu elevado custo.

**Tabela IV. 2. -** Efeito da composição lipídica na carga superficial dos lipossomas.

Formulação (Fx)	Composição lipídica (razão molar)	Potencial Zeta (mV)
F1	DOPC:DOPG <sup>(2)</sup> (7:3)	-41,1
F2	PC:PG (4:1)	-31,6 ± 0,9
F3	PC:Chol (10:1)	-1,7 ± 1,3
F4	PC:Chol:SA (10:1:1)	+15,3 ± 3,1

Fx: formulação identificada com o número "x", x = 1, 2, 3 ou 4



**Figura IV. 1.** – Efeito da composição lipídica nos rendimentos do processo e na incorporação de ORZ em lipossomas.

Na **Figura IV. 1.** encontra-se uma outra representação da variação do rendimento em ORZ e lípido e da E.I. das diversas formulações em função das composições lipídicas. Verifica-se que o rendimento em lípido sofre uma pequena dependência da composição lipídica, o mesmo não acontece com o rendimento de ORZ e a E.I.. Além disso, observa-se uma boa incorporação da ORZ nas formulações 1, 2 e 4. Estas formulações têm rendimentos semelhantes quer para a ORZ, quer para o lípido, dando portanto origem a E.I. também semelhantes. No entanto, a formulação 4 foi posta de parte devido ao facto de lipossomas com cargas superficiais negativas serem preferencialmente fagocitados pelos macrófagos e serem estas células o alvo do fármaco seleccionado [185; 224-227].

As formulações carregadas negativamente (F1 e F2) são semelhantes no que diz respeito à E.I. da ORZ e possuem os maiores rendimentos de fármaco, o que poderá estar relacionado com as condições experimentais na preparação dos lipossomas ( $\text{pH} \approx 6$ ) que conferem um carácter ligeiramente positivo à ORZ ( $\text{pKa} = 8,6$ ). Isto leva à ocorrência de interações electrostáticas que suplementam as interações hidrófobas, maximizando a incorporação do fármaco nos lipossomas com carga negativa. Devido ao elevado custo dos constituintes da formulação 1 (DOPC e DOPG), optou-se por prosseguir os estudos preliminares de optimização da incorporação de ORZ com a formulação 2.

A selecção desta formulação vai de encontro com trabalhos anteriormente desenvolvidos que demonstraram que lipossomas constituídos por PG serem

preferencialmente direccionados para os macrófagos do fígado (células de Kupffer) e do baço [131; 228-232].

## 1.2 – INFLUÊNCIA DO MÉTODO DE PREPARAÇÃO NOS PARÂMETROS DE INCORPORAÇÃO DE ORZIZALINA EM LIPOSSOMAS

A **Tabela IV. 3.** e a **Figura IV. 2.** apresentam os resultados correspondentes à incorporação da ORZ em lipossomas, com a composição lipídica PC:PG (4:1), obtidos por diferentes métodos de preparação, usando em todos uma concentração inicial de lípido total de 10  $\mu\text{mol/mL}$  e uma razão molar inicial ORZ/lípido de 1:10. Comparando os respectivos parâmetros de incorporação, observa-se que as eficiências de incorporação e a concentração intralipossomal de ORZ ( $[\text{ORZ/Lip}](f)$ ) são bastante semelhantes nos três métodos. No entanto, os rendimentos quer da ORZ quer do lípido já apresentam dependências do método de preparação, dando origem a valores diferentes. Os lipossomas do tipo DRV's, são altamente dependentes do meio de hidratação. A ausência de trealose (M1) influencia marcadamente os parâmetros referidos que são muito menores neste método. Dado que, o método de DRV's inclui um passo de liofilização, este é o passo limitante do rendimento do processo. O processo de liofilização na ausência de um crioprotector (M1) resultou numa perda significativa de fármaco ( $\eta(\text{ORZ}) = 54 \%$ ). Pela adição de trealose, observou-se uma maximização simultânea na retenção de lípido organizado em lipossomas e de fármaco nas estruturas lipossomais. No método de DRV's observaram-se retenções de ORZ aproximadamente de 74 % versus 54 % (**Tabela IV. 3.**) e de lípido de 96 % versus 73 %, após liofilização/re-hidratação na presença ou ausência de trealose, respectivamente (M2 versus M1).

Durante o processo de liofilização a bicamada lipídica dos lipossomas pode ser danificada, tanto pelo stress mecânico, causado pelas elevadas pressões a que as vesículas membranares são sujeitas durante a formação de cristais de gelo, como quimicamente, pelo aumento da concentração de fármaco junto das vesículas durante a secagem e desidratação. Assim verificou-se que a adição de um crioprotector (trealose) permitiu uma conservação das estruturas do lipossoma com aumento da sua estabilidade, possivelmente devido à trealose formar uma camada protectora envolvente ao estabelecer pontes de hidrogénio com os fosfolípidos da bicamada [134; 233; 234].

A liofilização com trealose não afectou o tamanho das vesículas, uma vez que comparando os dois métodos de preparação de DRV's (M1 e M2) não se observaram

diferenças no diâmetro médio das amostras após extrusão e ultracentrifugação (Tabela IV. 4.), sendo estes resultados concordantes com dados da literatura [235].

Nos lipossomas do tipo DRV's a re-hidratação dos liofilizados foi feita com água desmineralizada em vez de NaCl 154 mM, uma vez que vários estudos demonstraram que os parâmetros de incorporação aumentam significativamente quando a força iónica do meio de re-hidratação é reduzida [134; 236; 237]. Este efeito tem sido atribuído ao reforço das interacções electrostáticas fármaco-lípido, que são inibidas em meios de força iónica elevada, devido aos iões  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  competirem com o fármaco para os grupos polares das moléculas lipídicas [176].

**Tabela IV. 3.** – Influência do método de preparação nos parâmetros de incorporação de ORZ em lipossomas <sup>(1)</sup>.

Meio de hidratação	Método de preparação (Mx)	Rendimento ( $\eta$ ) (%)		[ORZ/Lip](i) (g/mol)	[ORZ/Lip](f) (g/mol)	E.I. (%)
		ORZ	Lípido			
NaCl 154mM	DRV's (M1)	54,0 $\pm$ 9,1	73,0 $\pm$ 8,0	41,2 $\pm$ 0,0	30,3 $\pm$ 2,4	73,7 $\pm$ 5,9
Trealose 300mM e NaCl 154 mM	DRV's (M2)	73,7 $\pm$ 3,3	96,4 $\pm$ 1,9	46,2 $\pm$ 0,0	35,3 $\pm$ 1,2	76,4 $\pm$ 2,7
NaCl 154mM	VET's (M3)	72,1 $\pm$ 4,9	97,4 $\pm$ 6,5	42,1 $\pm$ 0,0	31,8 $\pm$ 0,2	75,6 $\pm$ 0,5

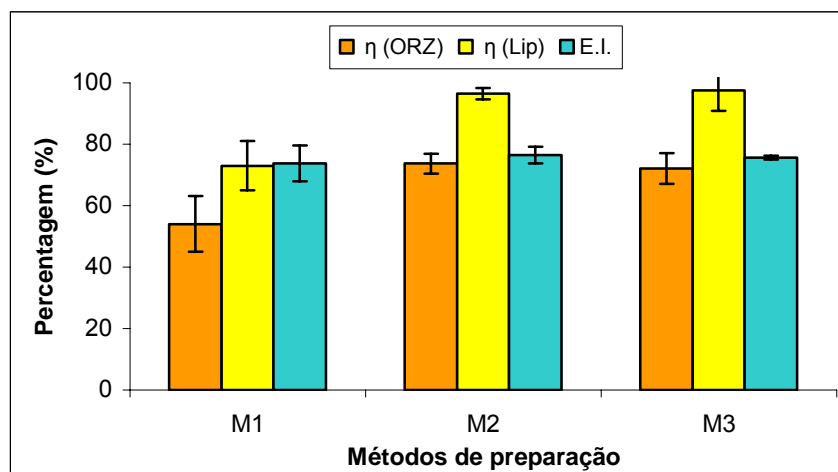
Cada valor representa a média  $\pm$  desvio padrão correspondentes a triplicados.

[ORZ/Lip](i): razão inicial fármaco/lípido; [ORZ/Lip](f): razão final fármaco/lípido;

E.I.: eficácia de incorporação; Mx: método de preparação identificado com o número "x", x = 1, 2 ou 3.

<sup>(1)</sup> Composição lipídica PC:PG (4:1). Concentração inicial de lípido total: 10  $\mu\text{mol/mL}$ .

Razão molar inicial ORZ/lípido: 1:10.



**Figura IV. 2.** – Influência do método de preparação na E.I., no  $\eta$ (ORZ) e no  $\eta$ (Lip).

Apesar de não se observarem diferenças significativas na E.I. de ORZ nos três métodos de preparação, existem diferenças substanciais quando analisados os rendimentos de ORZ e lípido dos DRV's sem trealose (M1) na etapa de hidratação do filme lipídico, com os DRV's com trealose (M2) e os VET's (M3). Assim, face aos resultados da **Figura IV. 2.** observa-se que os DRV's com trealose e os VET's apresentam parâmetros de incorporação superiores aos dos DRV's sem trealose. Com efeito, o método de DRV's como inclui um passo de liofilização terá que ter sempre trealose enquanto que os VET's (que não incluem este passo) não a necessitam para obter bons parâmetros de incorporação.

Qualquer um dos métodos testados deu origem a lipossomas semelhantes no que diz respeito à carga superficial (valor idêntico ao da F2 da **Tabela IV. 2.**). Relativamente à homogeneidade das dispersões (**Tabela IV. 4.**), traduzida pelo índice de polidispersão, verifica-se que o valor deste parâmetro, se manteve inferior e igual a 0,20 para os três métodos, revelando que as dispersões lipossomais são bastante homogêneas.

Perante os resultados obtidos e tendo que seleccionar um dos métodos referenciados anteriormente, optou-se pelo método 2 (M2), pois a possibilidade de liofilização com bons parâmetros de incorporação é sempre uma situação desejável para a conservação das amostras para testes futuros.

Tal como se pode observar na **Tabela IV. 4.**, as formulações preparadas pelo M3 têm um diâmetro ligeiramente superior ao dos DRV's (M2), obtendo-se parâmetros de incorporação semelhantes. Assim, a opção de seleccionar o M2, parece reforçada, uma vez que, sabendo-se que os parâmetros de incorporação aumentam com o tamanho dos lipossomas, pode prever-se que DRV's com tamanhos idênticos aos dos VET's teriam melhores resultados de incorporação.

**Tabela IV. 4.** - Diâmetro médio e potencial Zeta dos lipossomas <sup>(1)</sup> nos métodos 1, 2 e 3.

Meio de hidratação	Método de preparação (Mx)	Diâmetros (nm) [Poli.]		Potencial Zeta (mV)
		Aext	Af	
NaCl 154mM	DRV's (M1)	130 ± 2 [0,20]	133 ± 5 [0,15]	-29,8 ± 0,5
Trealose 300mM e NaCl 154 mM	DRV's (M2)	115 ± 2 [0,14]	118 ± 8 [0,19]	-31,1 ± 0,5
NaCl 154mM	VET's (M3)	162 ± 8 [0,13]	167 ± 2 [0,16]	-31,3 ± 1,0

Cada valor representa a média ± desvio padrão correspondentes a triplicados.

Mx: método de preparação identificado com o número “x”, x = 1, 2 ou 3;

Aext: amostra extrusada; Af: amostra final (após ultracentrifugação).

Poli.: índice de polidispersão

<sup>(1)</sup> Composição lipídica PC:PG (4:1). Concentração inicial de lípido total: 10 µmol/mL.

Razão molar inicial ORZ/lípido: 1:10.

Estes resultados estão de acordo com a literatura, pois a preparação de lipossomas pelo M2, permite uma maior incorporação de ORZ na matriz lipídica das estruturas lipossomais devido ao processo de liofilização e re-hidratação. Tal permite concentrar o fármaco junto das bicamadas lipídicas que são re-hidratadas na forma liofilizada e não num filme lipídico, o qual tem a desvantagem de funcionar como uma barreira semi-permeável dificultando a incorporação do fármaco, dando origem portanto a menores parâmetros de incorporação (M3) [236; 238].

### 1.3 – ESTUDO DE SATURAÇÃO DE INCORPORAÇÃO DE FÁRMACO

Numa formulação lipossomal, a concentração de fármaco intralipossômico, que é o agente bioactivo, adquire uma importância fundamental. Uma vez que estas formulações são desenvolvidas para fins terapêuticos, torna-se necessário saturar o sistema lipossomal de fármaco, de modo a que, após administração de uma determinada dose, esta seja suficiente para exercer o seu efeito terapêutico e seja necessário a menor quantidade possível do sistema de transporte, neste caso de lipossomas - lípido.

Este estudo de saturação foi realizado após a sequência de resultados obtidos anteriormente, ou seja seleccionada a melhor composição lipídica e o melhor método de preparação, uma vez que, os testes de saturação dependem da composição lipídica usada e do tipo de lipossomas.

Depois de seleccionada a composição lipídica PC:PG (4:1) e o método de preparação M2 (DRV's com trealose) fez-se o estudo do efeito das concentrações iniciais de lípido e de fármaco nas características finais dos lipossomas.

Prepararam-se lipossomas, usando uma concentração fixa de lípido total de 10  $\mu\text{mol/mL}$  e razões molares iniciais ORZ/lípido variáveis entre 1:10; 2:10 e 5:10.

A **Tabela IV. 5.** apresenta o efeito da razão ORZ/lípido, inicialmente seleccionada, nos parâmetros de incorporação, nomeadamente rendimento, concentração intralipossómica e eficácia de incorporação. Verifica-se que a razão ORZ/lípido inicial é altamente crítica no processo, influenciando os parâmetros de incorporação do fármaco. Aumentando a concentração inicial de fármaco de 1 para 2  $\mu\text{mol/mL}$ , correspondente à [ORZ/Lip](i) de 49,4 para 83,2 g/mol, observou-se um aumento da concentração de ORZ incorporada ([ORZ/Lip](f)) de 40,2 para 72,8 g/mol, enquanto que a E.I. se manteve praticamente constante, respectivamente cerca de 82 e 87 %. Esta situação altera-se para formulações preparadas com concentrações iniciais de ORZ acima de 2  $\mu\text{mol/mL}$ , correspondendo à [ORZ/Lip](i) de 160,3 g/mol. Não se observaram aumentos na concentração de ORZ incorporada, mantendo-se constante com uma [ORZ/Lip](f) de 72,5 g/mol.

**Tabela IV. 5.** – Efeito da razão inicial ORZ/lípido nos rendimentos de ORZ e lípido, na ORZ incorporada e na eficiência de incorporação.

Razão molar inicial ORZ/lípido	[ORZ/Lip](i) (g/mol)	Rendimento ( $\eta$ ) (%)		[ORZ/Lip](f) (g/mol)	E.I. (%)	Diâmetros (nm)
		ORZ	Lípido			
1:10	49,4 $\pm$ 0,6	50,4 $\pm$ 6,8	61,8 $\pm$ 7,2	40,2 $\pm$ 2,7	81,5 $\pm$ 5,4	122 $\pm$ 10
2:10	83,2 $\pm$ 0,3	53,3 $\pm$ 4,8	61,0 $\pm$ 5,7	72,8 $\pm$ 0,9	87,4 $\pm$ 1,0	130 $\pm$ 2
5:10	160,3 $\pm$ 0,8	27,6 $\pm$ 1,8	61,1 $\pm$ 5,6	72,5 $\pm$ 1,9	45,3 $\pm$ 1,2	140 $\pm$ 19

Cada valor representa a média  $\pm$  desvio padrão correspondentes a triplicados.

[ORZ/Lip](i): razão inicial fármaco/lípido; [ORZ/Lip](f): razão final fármaco/lípido;

E.I.: eficácia de incorporação.

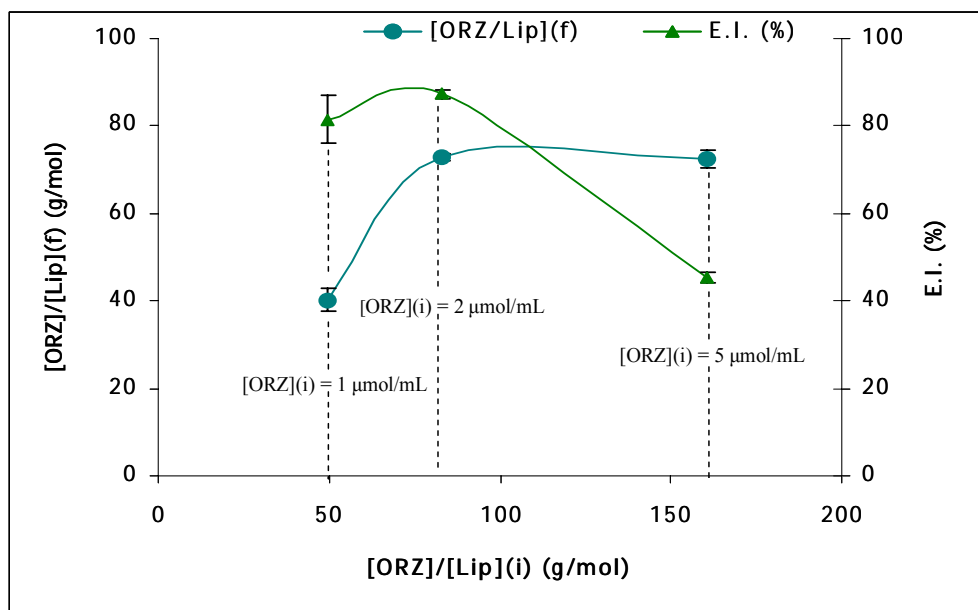
Concentração inicial de lípido total: 10  $\mu\text{mol/mL}$ .



A **Figura IV. 3.** descreve a curva de saturação de lipossomas com ORZ e a eficiência de incorporação para as condições descritas.

Estas experiências documentam que o sistema lipossomal não tem capacidade para suportar maiores quantidades de fármaco, atingindo-se a saturação para aproximadamente 73 g/mol.

A partir de valores iniciais de ORZ/lípido superiores a 83,2 g/mol, o rendimento de ORZ e a E.I. diminuem, pois a camada lipídica não tem capacidade para incorporar mais fármaco e todo o incremento fornecido será desperdiçado.



**Figura IV. 3.** – Representação da curva de saturação e da eficiência de incorporação da ORZ.

Nestas condições, a condição ideal para a preparação de ORZ lipossomal é obtida para uma  $[ORZ/Lip](i)$  cerca de 83 g/mol ( $[ORZ](i) = 2 \mu\text{mol/mL}$ ) em que se maximizaram os parâmetros da formulação,  $[ORZ/Lip](f)$  e E.I..

Os diâmetros obtidos para as diferentes formulações não mostraram variações significativas (ver **Tabela IV. 5.**), revelando que as formulações são semelhantes e que nas condições estudadas a concentração de fármaco não altera as suas características.

## 1.4 – ESTUDO DO EFEITO DO FOSFATIDILGLICEROL NA BICAMADA LIPOSSÓMICA

Após se ter concluído que a composição lipídica mais apropriada para a incorporação de ORZ em lipossomas correspondia à de PC:PG, desenvolveu-se um estudo para avaliar a influência do aumento da carga eléctrica negativa das vesículas nos parâmetros de incorporação de ORZ em lipossomas do tipo DRV's. Tal foi feito variando a proporção molar de PG em lipossomas constituídos por PC:PG.

Na sequência do estudo anterior, prepararam-se DRV's com uma proporção molar inicial ORZ/lípido de 2:10 e uma concentração total de lípido de 10  $\mu\text{mol/mL}$ , em que a proporção de PG para o título total varia entre 20 e 50 %.

Os resultados obtidos para os vários parâmetros de caracterização das formulações estão sumariados na **Tabela IV. 6.** Observou-se que para valores de [ORZ/Lip](i) próximos da saturação a razão ORZ/lípido final para as 3 formulações testadas não é significativamente diferente.

Assim, a incorporação de ORZ não é dependente do conteúdo das bicamadas em PG, dentro dos valores estudados. No entanto, a E.I., que é uma razão entre a [ORZ/Lip](f) e a [ORZ/Lip](i), variou significativamente. As razões do aumento deste parâmetro devem-se a uma ligeira diminuição da [ORZ/Lip](i) nas formulações 2 e 3 e a um ligeiro aumento da [ORZ/Lip](f) nas mesmas formulações.

**Tabela IV. 6.** – Efeito do PG em lipossomas (DRV's) com ORZ <sup>(1)</sup>.

Formulação (Fx)	Composição lipídica (razão molar) (% PG)	Rendimento ( $\eta$ ) (%)		[ORZ/Lip](i) (g/mol)	[ORZ/Lip](f) (g/mol)	E.I. (%)
		ORZ	Lípido			
F1	PC:PG (4:1) (20 %)	76,3 $\pm$ 6,7	93,6 $\pm$ 4,7	88,3 $\pm$ 5,7	71,9 $\pm$ 4,1	81,4 $\pm$ 4,6
F2	PC:PG (7:3) (30 %)	82,0 $\pm$ 6,6	80,5 $\pm$ 0,1	75,0 $\pm$ 3,4	76,4 $\pm$ 6,0	101,9 $\pm$ 8,0
F3	PC:PG (5:5) (50 %)	86,7 $\pm$ 2,6	88,0 $\pm$ 3,7	77,5 $\pm$ 3,1	76,4 $\pm$ 4,6	98,7 $\pm$ 6,0

Cada valor representa a média  $\pm$  desvio padrão correspondentes a triplicados.

[ORZ/Lip](i): razão inicial fármaco/lípido; [ORZ/Lip](f): razão final fármaco/lípido;

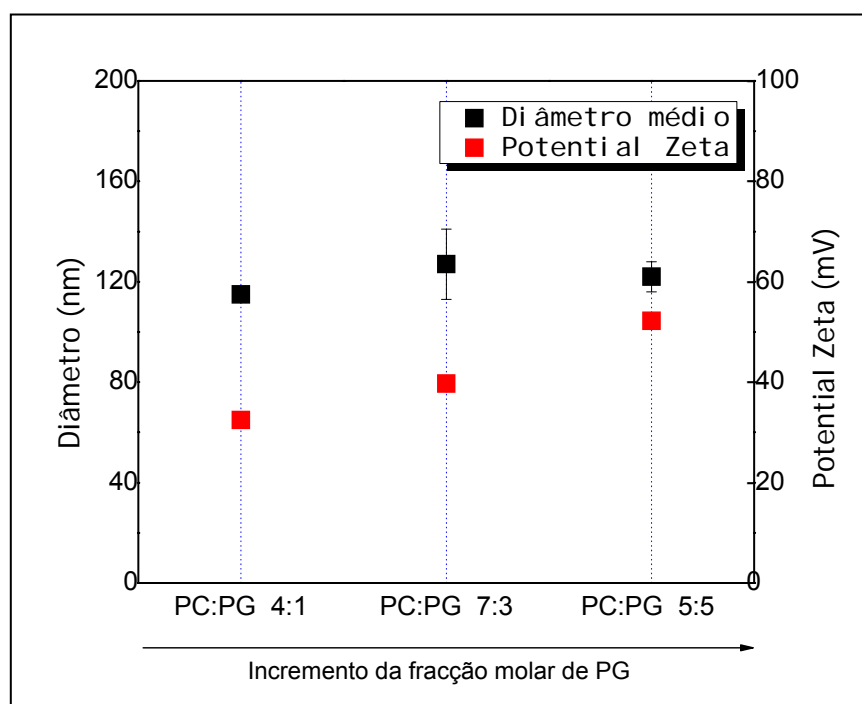
E.I.: eficácia de incorporação; Fx: formulação identificada com o número "x", x = 1, 2 ou 3;

% PG: percentagem de PG no lípido total.

Composição lipídica: PC:PG (PC:X, X=1, 3 e 5);

<sup>(1)</sup> Concentração inicial de lípido total: 10  $\mu\text{mol/mL}$ . Concentração inicial de ORZ: 2  $\mu\text{mol/mL}$ . Razão molar inicial ORZ/lípido: 2:10.

A **Figura IV. 4.** compara os diâmetros médios e os potenciais zeta das diversas formulações. Observa-se que os tamanhos das vesículas não são influenciados pelo aumento da proporção molar de PG (115 – 127 nm). No entanto e como seria de esperar, o incremento da fracção molar deste lípido negativo acarreta diferenças apreciáveis na carga superficial dos lipossomas, tornando-os mais negativos, concomitantemente com o aumento da carga negativa, variando de -32,5 mV para -52,2 mV quando o PG passa de 20 % a 50 % do lípido total.



**Figura IV. 4.** – Efeito do PG no diâmetro médio e no potencial zeta de DRV's contendo ORZ

Não existem na literatura estudos de biodistribuição referentes ao efeito do aumento da carga negativa na superfície dos lipossomas que nos permitam seleccionar uma das formulações anteriores. Assim, foi seleccionada a formulação com a composição lipídica PC:PG (4:1) para os estudos seguintes.

Em suma, após análise de diversos factores relacionados com a incorporação da ORZ em lipossomas, verificou-se que a carga eléctrica, o método de preparação e a presença de trealose nos DRV's influenciam marcadamente a inclusão deste agente bioactivo nas vesículas.

Foi ainda observado que o aumento da fracção molar de PG na composição lipídica dos lipossomas não afecta significativamente a incorporação de ORZ. Este

resultado também foi verificado na análise estatística da significância das variações para um intervalo de confiança de 95%.

Também o estudo de saturação revelou que pelo aumento da concentração inicial de fármaco se consegue atingir uma incorporação máxima para uma razão inicial fármaco/lípido de 2:10.

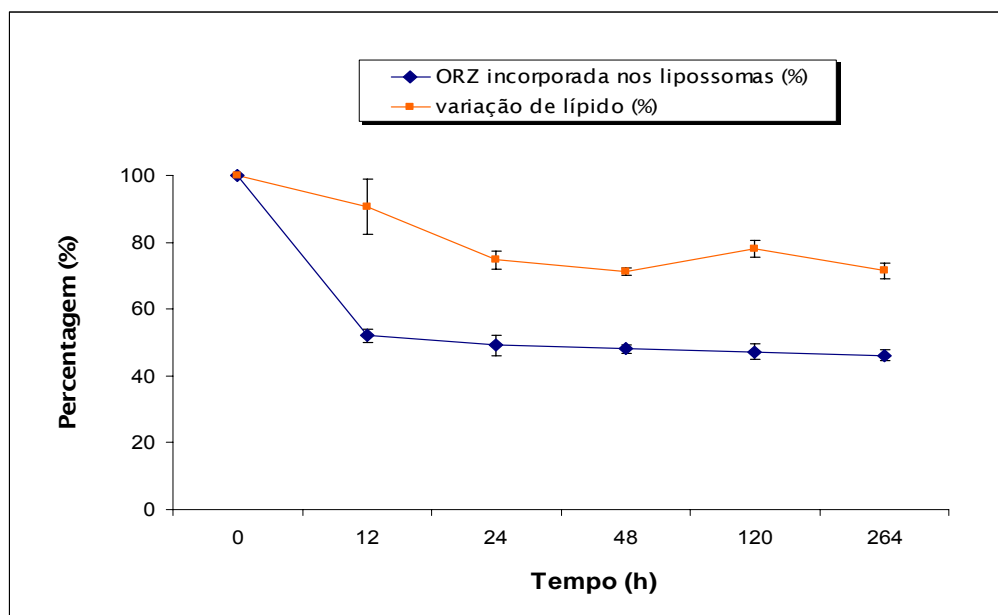
## 2 – ESTUDO DA ESTABILIDADE DE UMA SUSPENSÃO LIPOSSÓMICA CONTENDO ORIZALINA

Dado que a formulação lipossomal de ORZ tem como finalidade última a sua administração *in vivo*, é necessário estudar as condições em que essa formulação pode ser mantida sem perda das suas propriedades e qual o seu comportamento em condições semelhantes às do organismo. Assim, foram efectuados estudos de estabilidade, em duas condições: a primeira a 4 °C em soro fisiológico e a segunda a 37 °C em 1% de BSA. No estudo a 4 °C pretendeu-se observar o tempo de armazenamento da formulação ao fim do qual ocorrem alterações das propriedades físico-químicas conferidas no momento da preparação. O estudo a 37 °C e em presença de BSA teve como finalidade simular o comportamento dos lipossomas *in vivo*, uma vez que a albumina é a proteína plasmática que mais abundantemente se associa aos lipossomas na circulação sanguínea provocando a sua destabilização [147].

### 2.1 – ESTABILIDADE A 4 °C

Estudou-se a estabilidade de lipossomas contendo ORZ, do tipo DRV's, nas condições referidas na parte experimental em 2.4.1.

No gráfico da **Figura IV. 5.** está representado a variação de fármaco intralipossómico ao longo do tempo.



**Figura IV. 5.** – Retenção de ORZ nas vesículas e variação do lípido total ao longo do tempo.

Observou-se uma diminuição da percentagem de ORZ incorporada nos lipossomas com o tempo. Esta diminuição é bifásica, a primeira fase correspondente às primeiras doze horas, onde se observa uma difusão rápida do fármaco para o meio extralipossómico. Na segunda fase observa-se uma redução pouco significativa em que a cinética de libertação será próxima da ordem zero.

O perfil de libertação bifásica também é observado na razão fármaco/lípido (Tabela IV. 7.). Pela análise da Tabela IV. 7., observa-se que ao fim de 12 horas existe uma perda de fármaco intralipossómico na ordem dos 52 %, variando só até aos 46 % ao fim de 11 dias. O lípido sofre de uma variação pouco significativa ao longo do tempo, só de 7,7  $\mu\text{mol/mL}$  para 5,5  $\mu\text{mol/mL}$  em 11 dias. Daí que a razão ORZ/lípido siga praticamente o perfil de ORZ. De facto, a diminuição para metade do fármaco retido nos lipossomas é acompanhada por uma diminuição da razão fármaco/lípido de 75,5 g/mol para 43,5 g/mol, mantendo-se praticamente invariável até às 264 horas.

**Tabela IV. 7.** – Estabilidade em soro fisiológico <sup>(1)</sup>, à temperatura de 4 °C, de formulações lipossomais de ORZ.

DRV's de PC:PG (4:1) <sup>(2)</sup>						
Tempo (horas)	ORZ incorporada		[lípidio] (μmol/mL)	[ORZ/Lip](f) (g/mol)	Diâmetros (nm) [Poli.]	ΔØ (%)
	(μg/mL)	(%)				
0	581,9 ± 0,0	100 ± 0,0	7,7 ± 0,0	75,5 ± 0,0	131 ± 1 [0,20]	0
12	302,6 ± 11,2	52,0 ± 1,9	7,0 ± 0,6	43,5 ± 2,4	170 ± 5 [0,27]	30 ± 4
24	285,7 ± 18,8	49,1 ± 3,2	5,8 ± 0,2	49,6 ± 2,0	175 ± 5 [0,33]	34 ± 3
48	279,6 ± 8,1	48,1 ± 1,4	5,5 ± 0,1	50,9 ± 0,9	173 ± 8 [0,11]	32 ± 6
120	275,2 ± 13,4	47,3 ± 2,3	6,0 ± 0,2	45,8 ± 1,4	177 ± 2 [0,15]	35 ± 2
264	268,8 ± 9,5	46,2 ± 1,6	5,5 ± 0,2	48,8 ± 0,2	177 ± 11 [0,11]	35 ± 8

Cada valor representa a média ± desvio padrão correspondentes às determinações de triplicados de alíquotas.

(%): percentagem de ORZ nos lipossomas relativamente ao tempo 0; [lípidio]: concentração de lípidio; [ORZ/Lip](f): razão final fármaco/lípido; Poli.: índice de polidispersão; ΔØ: variação dos diâmetros,

calculados pela fórmula -  $\Delta \varnothing = \frac{(\varnothing_{final} - \varnothing_{inicial})}{\varnothing_{inicial}} \times 100$  .

<sup>(1)</sup> solução de NaCl 154 mM.

<sup>(2)</sup> Concentração inicial de lípidio total: 10 μmol/mL. Concentração inicial de ORZ: 2 μmol/mL. Razão molar inicial ORZ/lípido: 2:10.

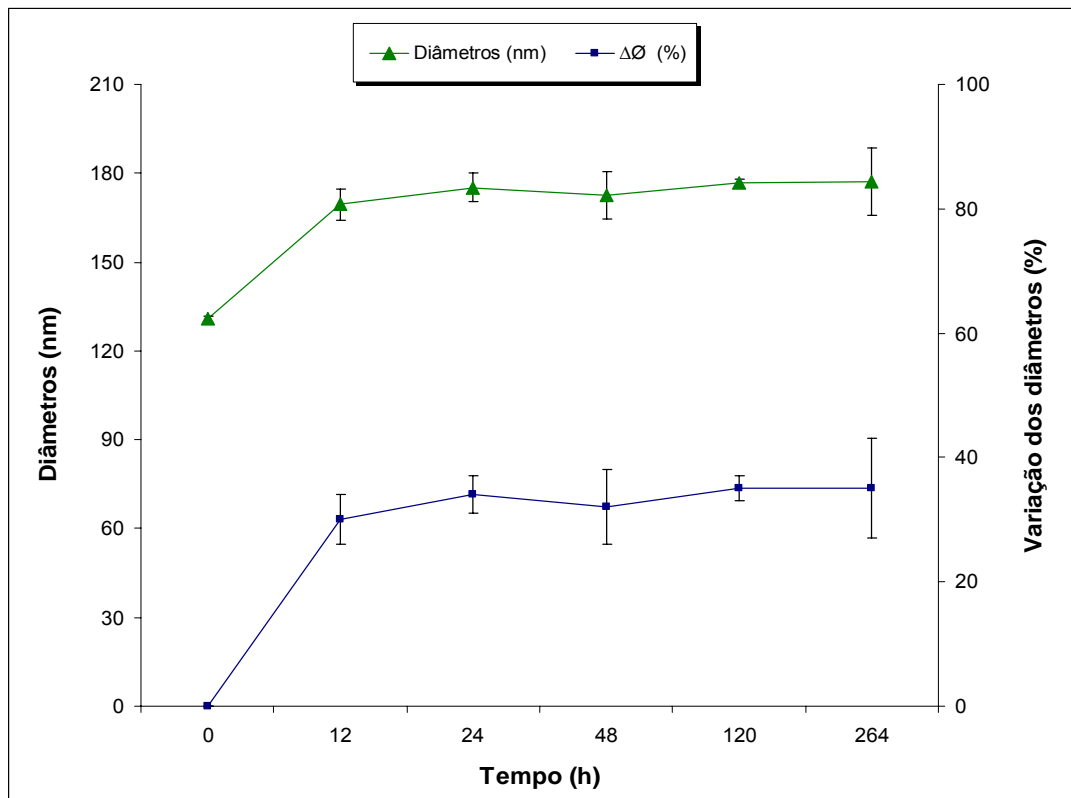
O perfil bifásico de difusão da concentração de fármaco incorporado para o meio extralipossômico está de acordo com o observado na literatura [176; 239]. Tal poderá dever-se, numa primeira fase (12 horas), a uma adaptação das vesículas ao meio aquoso (soro fisiológico), situação evidenciada pelo aumento de 30 % no tamanho dos lipossomas nas primeiras doze horas de conservação, provavelmente como resposta à variação da concentração inerente ao factor de diluição (Tabela IV. 7. e Figura IV. 6.). Esta adaptação, com aumento de volumes poderá levar ao aumento de permeabilidade das vesículas lipossomais e consequente libertação do fármaco sobretudo nas primeiras

12 horas. O aumento do diâmetro das vesículas é mais significativo nesse intervalo de tempo, variando posteriormente só até 35 %, ao fim de 264 horas. Por outro lado, a ocorrência de uma destruição das vesículas foi posta de parte, uma vez que, o lípido se manteve constante. Na segunda fase de conservação, os lipossomas não sofrem alterações apreciáveis, no que diz respeito à concentração de ORZ incorporada e de lípido, à razão ORZ/lípido e ao diâmetro médio das vesículas (**Tabela IV. 7.**), pelo que as vesículas parecem estabilizadas. A qualidade da dispersão lipossomal, durante o período em estudo, observada pelo índice de polidispersão é satisfatória, situando-se entre 0,11 e 0,33. O facto das dispersões lipossomais serem homogêneas ao longo do tempo e as vesículas conservarem os seus tamanhos, revela que não ocorreram fenómenos de fusão/agregação. Esta estabilidade física deve-se à presença de PG na composição lipídica dos lipossomas que lhes confere uma carga eléctrica negativa, proporcionando a ocorrência de repulsões electrostáticas que contribuem para uma menor tendência das vesículas em agregarem [172].

A eficiência de incorporação (E.I.) manteve-se, após as doze primeiras horas, em aproximadamente 60 % (valor omitido nos resultados), sugerindo uma estabilidade bastante satisfatória. No entanto, estes resultados de estabilidade em soro fisiológico apresentam valores consideravelmente inferiores a dados da literatura referentes a outros agentes bioactivos. Comparativamente, formulações lipossomais contendo L-asparaginase, desenvolvidas por Cruz *et al.* (1993) obtiveram, eficiências de incorporação de 87 e 95 %, ao fim de 15 dias em soro fisiológico, para as composições lipídicas PC:Chol:SA e DMPC:Chol:SA, respectivamente. Estes autores usaram lipossomas do tipo DRV's, carregados positivamente e com uma enzima hidrófila incorporada no espaço interno aquoso [176]. Um fenómeno idêntico foi também observado por Constantino *et al.* (1993), os quais verificaram que formulações lipossomais de rifampicina com  $T_i$  baixa e sendo constituídas por PG ou por uma mistura de PG e PC obtiveram eficiências de incorporação entre 92 e 98 %, nas mesmas condições [141]. De facto, lípidos com carga eléctrica são um factor determinante para a conservação dos lipossomas em soro fisiológico. A conservação do fármaco hidrófobo depende da interacção entre o mesmo e os fosfolípidos, variando portanto com o lípido e o agente bioactivo.

Por fim, podemos concluir que a estabilidade destes DRV's com ORZ, em soro fisiológico e nas condições mencionadas, é satisfatória. Durante um período de, pelo menos, 11 dias, os lipossomas com este fármaco poderão ser utilizados, uma vez que, o

meio de conservação apenas provoca alterações nas suas características numa primeira fase, mantendo-se uma retenção apreciável de ORZ entre as 12 e as 264 horas.



**Figura IV. 6.** – Representação gráfica da variação dos diâmetros médios das vesículas em soro fisiológico, ao longo do tempo.

## 2.2 – ESTABILIDADE A 37 °C

O estudo da estabilidade de lipossomas contendo ORZ a 37 °C em BSA, teve como objectivo avaliar o seu comportamento em situações que possam simular o ambiente *in vivo*. A simulação do comportamento da proteína plasmática mais abundante na circulação sanguínea, permite-nos obter informações acerca da adsorção das restantes proteínas plasmáticas, tais como as opsoninas que têm um papel determinante na destruição e eliminação dos lipossomas *in vivo*. Inúmeros trabalhos com BSA têm sido desenvolvidos de forma a interpretar as interações estabelecidas com os lipossomas [240-247]. Estes autores demonstraram que as moléculas de albumina têm tendência a serem adsorvidas na superfície dos lipossomas e penetrarem na bicamada lipídica, onde



estabelecem interações hidrófobas com a matriz, provocando um aumento da permeabilidade da mesma. De facto o mesmo tipo de interações foram sugeridas para a maioria das proteínas plasmáticas [147; 248]. Para tal foi feito o teste, à temperatura fisiológica, na presença desta proteína padrão para simular as proteínas plasmáticas responsáveis pela destabilização dos lipossomas.

A **Tabela IV. 8.** apresenta os resultados relativos à retenção de ORZ nos lipossomas. A variação da percentagem de fármaco retido nas vesículas, durante o período em estudo, também apresentou um perfil de libertação bifásico. Enquanto que na primeira fase se verifica uma diminuição simultânea do teor de ORZ lipossómica e de lípido (burst release). Na segunda fase observa-se que pelo menos até às 24 horas os lipossomas se mantêm estáveis sem qualquer perda de fármaco e lípido. Com efeito, nos primeiros 30 minutos existe uma redução da ORZ incorporada na ordem dos 30 % que é acompanhada por uma diminuição da concentração de lípido de 7  $\mu\text{mol/mL}$  para 5,3  $\mu\text{mol/mL}$  (redução de aproximadamente 25 %). Nos restantes intervalos de tempo, correspondentes à segunda fase, a percentagem de ORZ incorporada e a concentração de lípido mantiveram-se constantes (cinética de ordem zero). Ambas as grandezas possuem o mesmo perfil ao longo do tempo (ver **Figura IV. 7.**). A perda de fármaco é proporcional à de lípido, daí que a razão ORZ/lípido se mantenha praticamente invariável com cerca de 42 g/mol.

Relativamente ao índice de polidispersão (**Tabela IV. 8.**) observa-se uma grande heterogeneidade populacional às 0,5 horas, demonstrando que a presença de BSA provoca variações nos tamanhos das vesículas, afectando a capacidade de retenção de ORZ nas mesmas em cerca de 30 %. No entanto, após avaliação global da qualidade da dispersão lipossomal, verificou-se que a partir das 4 horas o diâmetro médio das vesículas e índice de polidispersão se mantiveram constantes e na ordem de aproximadamente 115 nm e 0,2, respectivamente. Tais resultados indicam que após o primeiro impacto da albumina as vesículas se mantêm estáveis durante, pelo menos 20 horas.

**Tabela IV. 8.** – Estabilidade a 37 °C em BSA <sup>(1)</sup> de formulações lipossomais de ORZ.

DRV's de PC:PG (4:1) <sup>(2)</sup>						
Tempo (horas)	ORZ incorporada		[lípidio] (μmol/mL)	[ORZ/Lip](f) (g/mol)	Diâmetros (nm) [Poli.]	ΔØ (%)
	(μg/mL)	(%)				
0	302,6 ± 11,2	100 ± 3,7	7,0 ± 0,6	43,5 ± 2,4	170 ± 5 [0,27]	0
0,5	220,6 ± 15,4	72,9 ± 5,0	5,3 ± 0,1	41,8 ± 3,2	161 ± 3 [0,69]	-5 ± 2
4	193,7 ± 15,3	64,0 ± 5,1	5,0 ± 0,4	38,6 ± 1,8	121 ± 7 [0,18]	-29 ± 4
8	217,6 ± 7,2	71,9 ± 2,4	5,4 ± 0,0	40,5 ± 1,5	113 ± 0 [0,20]	-34 ± 0
24	243,9 ± 25,5	80,6 ± 8,4	4,9 ± 0,5	50,7 ± 7,5	119 ± 4 [0,26]	-30 ± 2

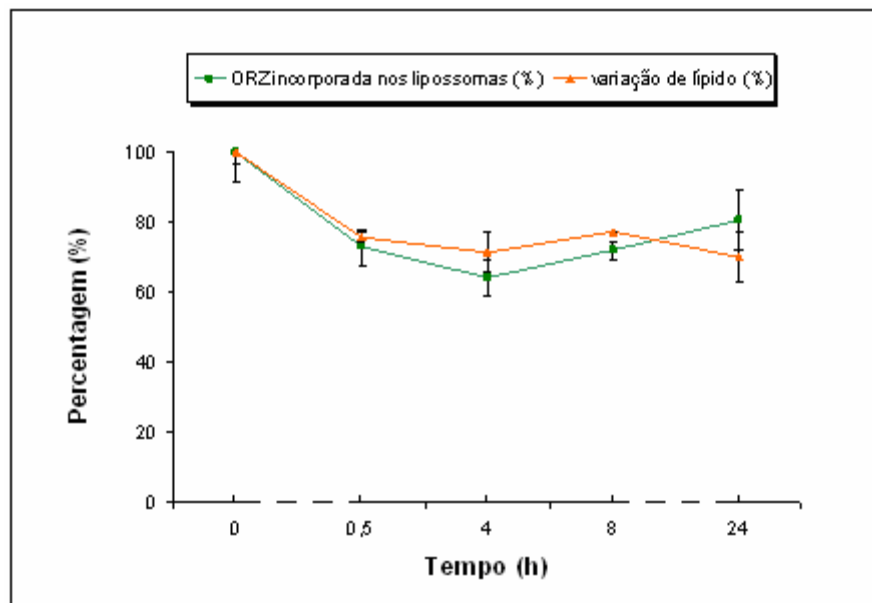
Cada valor representa a média ± desvio padrão correspondentes às determinações de triplicados de alíquotas.

(%): percentagem de ORZ nos lipossomas relativamente ao tempo 0; [lípidio]: concentração de lípidio; [ORZ/Lip](f): razão final fármaco/lípido; Poli.: índice de polidispersão; ΔØ: variação dos diâmetros,

calculados pela fórmula -  $\Delta \varnothing = \frac{(\varnothing_{final} - \varnothing_{inicial})}{\varnothing_{inicial}} \times 100$  .

<sup>(1)</sup> solução de ácido cítrico 10 mM/NaCl 145 mM com 2% de BSA .

<sup>(2)</sup> Concentração inicial de lípidio total: 10 μmol/mL. Concentração inicial de ORZ: 2 μmol/mL. Razão molar inicial ORZ/lípido: 2:10.



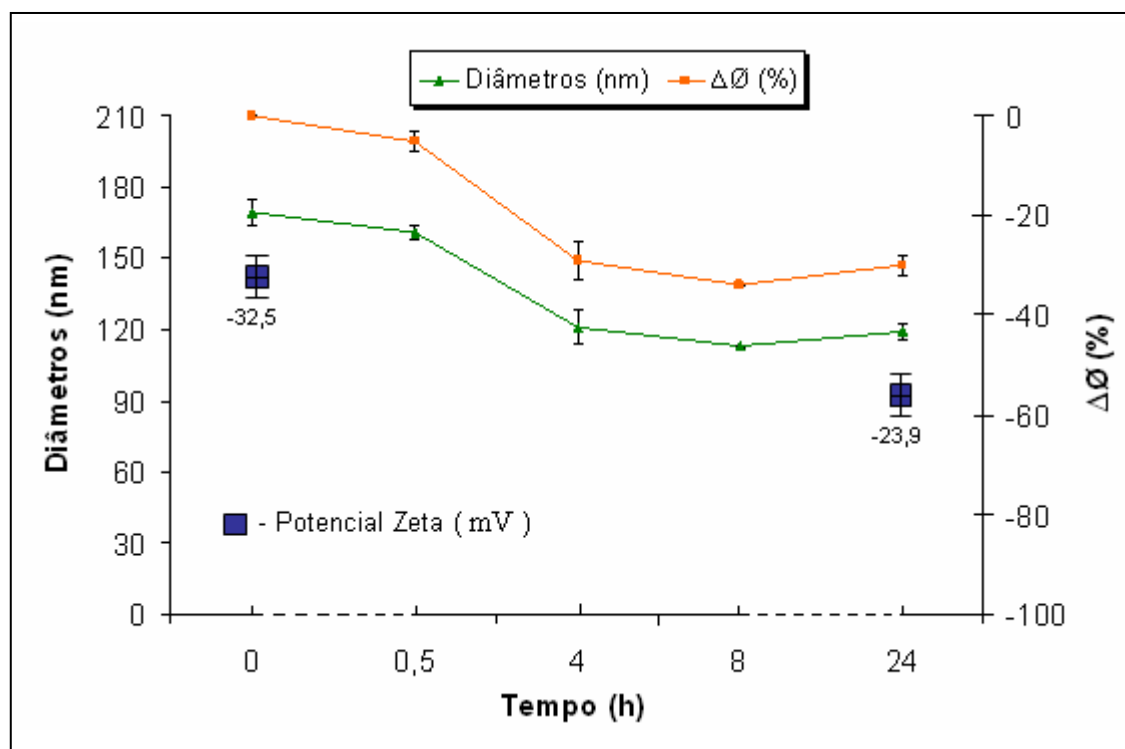
**Figura IV. 7.** - Retenção de ORZ nas vesículas e variação do lipídio total ao longo do tempo.

A **Figura IV. 8.** apresenta a variação dos diâmetros das vesículas em BSA durante 24 horas. Verifica-se que, no período estudado, as vesículas sofrem alterações significativas no que respeita ao diâmetro médio, relativamente aos que exibiam no momento da sua preparação. A morfologia das vesículas sofreu uma variação de aproximadamente 30 % ao fim de 4 horas, diminuindo o tamanho de 170 nm para 121 nm. As alterações estruturais do sistema lipossomal estão em concordância com a diminuição da concentração de lipídio total de 7  $\mu\text{mol/mL}$  para 5  $\mu\text{mol/mL}$  (redução de aproximadamente 30 %). Tal situação poderá dever-se a uma adsorção da albumina na superfície lipossomal, levando a uma perda e rearranjo dos lípidos da bicamada. Outra justificação para a diminuição do tamanho das vesículas poderá ser devido à maior osmolaridade do meio extralipossômico provocada pela presença de BSA. Os lipossomas como osmómetros perfeitos ao responderem a este choque osmótico libertam água dos compartimentos internos aquosos, levando a uma redução dos seus volumes. Quanto ao potencial zeta, os valores revelaram haver um decréscimo na carga negativa dos lipossomas de -32,5 mV para -23,9 mV, após diluição da suspensão de DRV's em BSA. Estes dados sugerem dois possíveis mecanismos:

1. Desorganização de membrana pela adsorção preferencial da albumina aos fosfolípidos carregados negativamente que são retirados da membrana do lipossoma, de acordo com a interpretação de Hernandez-Caselles *et al.* (1993), Chonn *et al.* (1992) e Cullis *et al.* (1998) [147; 156; 249].

- Ocorrência de interações electrostáticas entre os resíduos da proteína carregados positivamente e os fosfolípidos com carga negativa que disfarçam a carga negativa inicial dos fosfolípidos [250].

Perante estes resultados, podemos concluir que os lipossomas do tipo DRV's com uma composição lipídica PC:PG (4:1) e uma razão inicial ORZ/lípido de 2:10, proporcionam níveis de retenção de ORZ incorporada nos lipossomas de cerca de 70 %, ao fim de 24 horas em BSA, sendo um bom indicador para a estabilidade destas formulações *in vivo*. Estes resultados apresentam-se concordantes com os obtidos por autores, como Cruz *et al.* (1993) e Constantino *et al.* (1993) para formulações com carga negativa contendo L-asparaginase e rifampicina, respectivamente [141; 176].



**Figura IV. 8.** – Representação gráfica do potencial zeta de formulações, recém preparadas e em BSA durante 24 horas, e da variação do diâmetro médio das vesículas ao longo do tempo.

### 3 – AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE BIOLÓGICA

Nesta fase do trabalho pretendia-se avaliar a actividade terapêutica da ORZ quer na forma lipossomal, quer na forma livre.

Esta avaliação seria realizada através da redução da carga parasitária no baço dos animais tratados comparativamente com os não tratados e com um fármaco padrão, sendo os resultados expressos como a percentagem de inibição em relação ao grupo de controlo negativo.

Após a infecção dos murganhos, tal como descrito nos métodos em 2.4.2, semanalmente, foram eutanasiados grupos de três animais para determinação da carga parasitária do baço pelos métodos de diluição limite e de impressões em lâmina descritos na parte experimental em 2.4.3.

Após observação das lâminas e das microplacas, para os grupos eutanasiados, não foram identificadas células amastigotas e promastigotas, respectivamente (ver **Figura IV. 9.**).

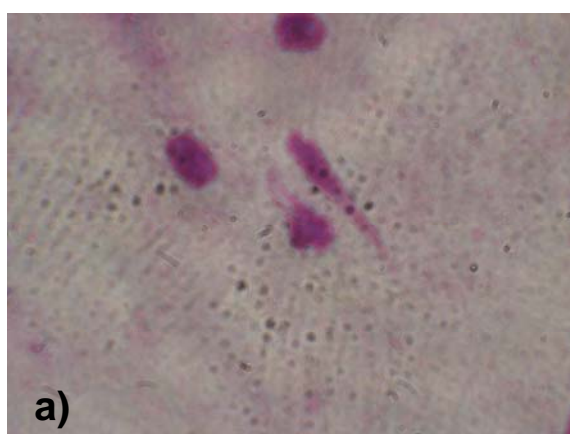


Imagem observada ao microscópio óptico, na objectiva de 100X.

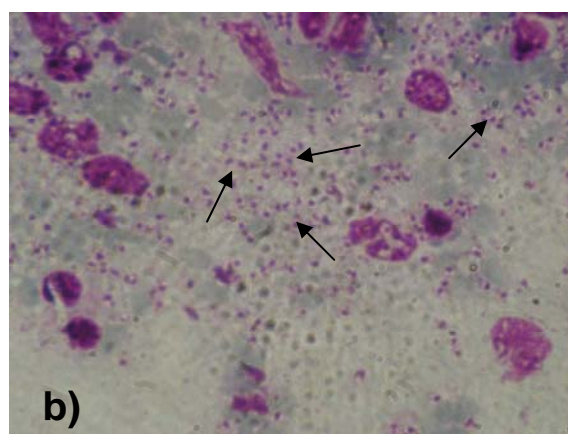


Imagem de amastigotas observados ao microscópio óptico, na objectiva de 100X.

As setas identificam alguns amastigotas no campo visualizado.

**Figura IV. 9.** – Imagens de impressões de baço coradas com solução Giemsa, visualizadas ao microscópio óptico:

- a) imagem de um campo visualizado na minha experiência (não se observam amastigotas).
- b) imagem fornecida pelo INETI a título comparativo (observa-se um grande número de amastigotas).

Embora se tenha realizado a infecção dos animais, tal como descrito nos métodos, os murganhos não evidenciaram quaisquer sintomas de infecção dois meses após a inoculação da estirpe de *L.infantum* MON-1 (MCAN/PT/94/IMT 205).

A confirmação da ausência de amastigotas no baço dos murganhos BALB/c obteve-se por PCR (polymerase chain reaction), não havendo amplificação de fragmentos de DNA característicos (não houve amplificação da sequência nº AF169140 da base de dados Genbank, pelos primers MC1 e MC2 da *L.infantum*), nos baços analisados. A detecção destes parasitas por PCR foi realizada na Unidade de Leishmanioses/Centro de Malária e Outras Doenças Tropicais do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (Lisboa, Portugal), colaboradores do projecto “**Liposomal formulations of dinitroanilines for treatment of canine leishmaniasis**”, no âmbito do qual foi realizado este trabalho.

Uma das dificuldades do uso de murganhos como um modelo de infecção deve-se ao facto de injectar os parasitas por via intraperitoneal de forma a induzir padrões reprodutivos de colonização no fígado e no baço. Esta via de administração não se assemelha à infecção natural induzida pelo vector. Além disso, o isolamento e a manipulação destes parasitas dependem do pH e da temperatura [251-255]. Variações nestes parâmetros afectam a viabilidade dos parasitas e os factores de virulência dos mesmos.

Outros problemas no estabelecimento do modelo animal de leishmaniose visceral podem dever-se à possibilidade destes animais possuírem uma resistência inata aos parasitas, de acordo com a interpretação de Crocker e Bradley [256; 257]. A resistência ou susceptibilidade da infecção em murganhos é controlada pelo gene Lsh do cromossoma 1. Este mecanismo de resistência pensa-se ser idêntico ao desenvolvido pelos genes Ity e Bcg, os quais controlam a resposta humoral inata a infecções por *Salmonella typhimurium* e *Mycobacterium bovis*, respectivamente.

Pelas razões mencionadas acima, podemos concluir que a eficiência da infecção não depende exclusivamente do parasita mas também do genótipo do hospedeiro.

Nestas circunstâncias, a não ocorrência de infecção não permitiu a realização dos testes de actividade biológica inicialmente previstos. Contudo, foi feita uma segunda infecção que se encontra actualmente em curso.

## **V. - CONCLUSÃO**





As dificuldades de diagnóstico e tratamento da leishmaniose são enormes, sendo agravadas pelo facto de ser uma doença existente, predominantemente, em países em vias de desenvolvimento. Poucos países estão interessados em injectar fundos no combate a esta doença.

Além disso, a co-infecção com HIV vem referenciada pela OMS como sendo uma doença emergente, especialmente na bacia do Mediterrâneo (onde há mais dados epidemiológicos), sendo Portugal um dos países que faz parte do relatório publicado em 2002 [258].

O aparecimento de estirpes resistentes e a limitação de conhecimentos acerca dos mecanismos pelos quais os parasitas adquirem resistência são o maior obstáculo para o controlo desta doença. É então necessário um melhor conhecimento dos mecanismos de resistência e do mecanismo de acção dos leishmanicidas de modo a haver um uso mais racional destes fármacos, minimizar o desenvolvimento de resistência e conseguir tratamentos mais eficazes [47].

A incidência de leishmaniose tem vindo a aumentar devido a múltiplos factores, entre os quais a infecção pelo HIV, o aumento do tráfego e conflitos internacionais, a falta de vacinas eficazes, a dificuldade em controlar os vectores, e o desenvolvimento de resistências à quimioterapia. Assim torna-se necessário o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos, possíveis vacinas e/ou novas estratégias de tratamento.

Os sistemas lipossómicos podem ser bons candidatos para o transporte de fármacos anti-leishmaniais, pelo facto de ser constituídos por componentes similares aos das membranas biológicas, serem biodegradáveis e biocompatíveis. Além disso, a captação preferencial destas vesículas pelo SMF, abre, no caso particular da leishmaniose, importantes perspectivas na terapêutica desta patologia.

Uma vez que não existem na literatura científica dados relativos à incorporação de ORZ em lipossomas, o desenvolvimento destes sistemas e a sua correcta caracterização, para futura avaliação *in vivo*, revela-se de extrema importância. Este foi o objectivo da presente dissertação.

As conclusões obtidas demonstraram que a magnitude de incorporação de ORZ em lipossomas depende marcadamente da composição lipídica (nomeadamente a presença de colesterol ou de lípidos electricamente carregados), do método de preparação, da presença ou ausência de crioprotectores no processo de liofilização pelo

método de DRV's e das condições iniciais (concentração de fármaco e lípido e sua razão molar).

Após a caracterização físico-química das várias formulações preparadas, foi necessário analisar os parâmetros de incorporação de cada uma e seleccionar a melhor formulação para efectuar estudos de estabilidade em soro fisiológico e em BSA.

Verificou-se que a incorporação de ORZ foi superior em composições sem colesterol, devido à competição que este tem com a ORZ para a incorporação na matriz dos lipossomas. Verificou-se ainda que a incorporação do fármaco foi superior nos lipossomas aniónicos de composição lipídica PC:PG (e DOPC:DOPG), não tendo sido observado relação entre a incorporação do fármaco e a densidade de carga (entre 20 e 50 % de PG).

O potencial zeta e a verificação do diâmetro dos lipossomas revelaram serem bons parâmetros que evidenciam a estabilidade dos lipossomas, podendo servir para o controlo da qualidade dos mesmos.

No estudo da influência da metodologia de preparação dos lipossomas nos parâmetros de incorporação de ORZ, verificou-se que os lipossomas preparados segundo o método de Kirby e Gregoriadis [177], usando trealose na etapa de liofilização, apresentaram níveis de incorporação de ORZ superiores aos obtidos com os lipossomas do tipo VET's, de acordo com Cruz *et al.* (1989) [236]. Além disso, a etapa de liofilização dos DRV's possibilita a conservação das amostras para testes futuros com resultados fracamente positivos, tal como observado por diversos autores [259-261].

Uma vez que os lipossomas são saturáveis com o fármaco, dever-se-á estudar a evolução da saturação das membranas para avaliar em que zona de concentração se deve trabalhar. Assim obteve-se uma saturação de incorporação em ORZ, nos lipossomas do tipo DRV's, com uma razão molar fármaco/lípido de 2:10, optando-se por prosseguir os estudos com esta formulação e nestas condições experimentais.

A estabilidade da formulação lipossómica de ORZ, em soro fisiológico e conservada à temperatura de 4 °C pode considerar-se satisfatória. Após as primeiras 12 horas e durante, pelo menos, 11 dias, a formulação manteve uma eficiência de incorporação de aproximadamente 60 % sem alteração das suas características, podendo ser utilizada com segurança durante este período.

O estudo de estabilidade a 37 °C e na presença de BSA, demonstrou que houve conservação de cerca de 70 % de ORZ incorporada, e ainda de 70 % do lípido total e uma pequena alteração do diâmetro. Tal indica que os lipossomas, em condições semelhantes aos organismos vivos contêm uma quantidade apreciável de ORZ incorporada, mantendo-se estáveis.

Em conclusão, estes resultados demonstraram a possibilidade de incorporar eficazmente ORZ em lipossomas, de os caracterizar sistematicamente através de parâmetros fiáveis, como a concentração de fármaco incorporado, rendimentos, eficácias de incorporação, diâmetro médio e potencial zeta. Tais parâmetros permitiram seleccionar o método de preparação mais apropriado, a composição lipídica, as condições de estabilidade e simular o seu comportamento *in vivo*.

Os resultados obtidos apontam para o interesse da realização de experiências em modelos animais com vista à avaliação das reais potencialidades terapêuticas da formulação lipossomal de ORZ desenvolvida e aqui caracterizada.

A continuação deste trabalho prevê o estudo de estabilidade das formulações na forma liofilizada, à temperatura ambiente e a baixas temperaturas, a realização de estudos de toxicidade e biodistribuição e o estabelecimento do modelo animal de leishmaniose visceral para testes de actividade terapêutica.



## **VI. - BIBLIOGRAFIA**



1. Oliveira, C. I., Teixeira, M. J., Gomes, R., Barral, A., and Brodskyn, C. Animal models for infectious diseases caused by parasites: Leishmaniasis. *Drug Discovery Today: Disease Models* 1(1), 81-86. 2004.
2. <http://www.vet.uga.edu/vpp/NSEP/BRAZIL2002/Leishmania/Port/Index.htm> (2002)
3. <http://www.who.int/emc/diseases/leish/index.html> (2001)
4. World Health Organization. Tropical diseases: progress in research 1989 - 1990. 1991. Genova. Special Program for Research and Training in Tropical Diseases.
5. Desjeux P. (1996) "Leishmaniasis. Public health aspects and control". *Clin.Dermatol.* 14, 417-423
6. Pearson R.D. & Sousa A.Q. (1996) "Clinical spectrum of Leishmaniasis". *Clin.Infect.Dis.* 22, 1-13
7. Handman E. (1999) "Cell biology of Leishmania". *Adv.Parasitol.* 44, 1-39
8. Dereure J., Reynes J., Pratlong F., Lamaury I., Rioux J.A., Janbon F. & Dedet J.P. (1995) "Visceral leishmaniasis in HIV-infected patients in the south of France". *Bull.World Health Organ* 73, 245-246
9. Montalban C., Calleja J.L., Erice A., Laguna F., Clotet B., Podzamczar D., Cobo J., Mallolas J., Yebra M. & Gallego A. (1990) "Visceral leishmaniasis in patients infected with human immunodeficiency virus. Co-operative Group for the Study of Leishmaniasis in AIDS". *J.Infect.* 21, 261-270
10. Rosenthal E., Marty P., Poizot-Martin I., Reynes J., Pratlong F., Lafeuillade A., Jaubert D., Boulat O., Dereure J., Gambarelli F. & . (1995) "Visceral leishmaniasis and HIV-1 co-infection in southern France". *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* 89, 159-162
11. Robert L.S. & Janovy J.J. (2000) in: **Foundations of Parasitology**, McGraw-Hill Higher Education, Boston,
12. Murray H.W. & Nathan C.F. (1999) "Macrophage microbicidal mechanisms *in vivo*: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*". *The Journal of Experimental Medicine* 189, 741-746
13. Choi C.M. & Lerner E.A. (2001) "Leishmaniasis as an emerging infection". *J.Investig.Dermatol.Symp.Proc.* 6, 175-182
14. Marzochi, M. C. A. and Marzochi, K. B. F. Tegumentary and Visceral Leishmaniasis in Brazil - Emerging Anthroponosis and Possibilities of Their Control. *Cadernos de Saúde Pública* 10(2), 359-378. 1994.
15. W.H.O. Strategic Direction for Research on Leishmaniasis. 2002. Genova, World Health Organization. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases.
16. Croft S.L. & Coombs G.H. (2003) "Leishmaniasis--current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs". *Trends Parasitol.* 19, 502-508
17. Grimaldi G., Jr., Tesh R.B. & McMahon-Pratt D. (1989) "A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World". *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 41, 687-725

18. Grimaldi G., Jr. & Tesh R.B. (1993) "Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research". *Clin.Microbiol.Rev.* 6, 230-250
19. Avlonitis N., Lekka E., Detsi A., Koufaki M., Calogeropoulou T., Scoulica E., Siapi E., Kyrikou I., Mavromoustakos T., Tsotinis A., Grdadolnik S.G. & Makriyannis A. (2003) "Antileishmanial ring-substituted ether phospholipids". *J.Med.Chem.* 46, 755-767
20. Lainson R. & Shaw J.J. (1987) in: ***The leishmaniasis in Biology and Medicine*** (Peter W. & Killick-Kendrick R., eds.), Academic Press,
21. Handman E. (2001) "Leishmaniasis: current status of vaccine development". *Clin.Microbiol.Rev.* 14, 229-243
22. World Health Organization. Tropical disease research. 701. 2000.
23. <http://www.sucen.sp.gov.br/doencas/index.htm> (2002)
24. Bryceson A. (1996) in: ***Manson's Tropical Diseases*** (Cook G.C., ed.), Saunders, W.P., Londres, pp. 1213-1243
25. Sacks D. & Kamhawi S. (2001) "Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis". *Annu.Rev.Microbiol.* 55, 453-483
26. Cunningham A.C. (2002) "Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania". *Exp.Mol.Pathol.* 72, 132-141
27. Bates P.A. & Rogers M.E. (2004) "New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of Leishmania". *Curr.Mol.Med* 4, 601-609
28. Chang K.P. (1990) in: ***Modern Parasite Biology: Cellular, Immunological and Molecular Aspects*** (Wyler D.J., ed.), Freeman, W.H. and Company, Nova Iorque, pp. 79-90
29. Killick-Kendrick, R. The life-cycles of *Leishmania* in the sand fly and transmission of leishmaniasis by bite. 2002. Sevilha, Espanha, Intervet. 2<sup>nd</sup> International Canine Leishmaniasis Forum - Canine Leishmaniasis: Moving Towards a Solution.
30. Descoteaux A. & Turco S.J. (1999) "Glycoconjugates in Leishmania infectivity". *Biochim.Biophys.Acta* 1455, 341-352
31. Pimenta P.F., Modi G.B., Pereira S.T., Shahabuddin M. & Sacks D.L. (1997) "A novel role for the peritrophic matrix in protecting Leishmania from the hydrolytic activities of the sand fly midgut". *Parasitology* 115 ( Pt 4), 359-369
32. Rogers M.E., Chance M.L. & Bates P.A. (2002) "The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of Leishmania mexicana by the sandfly Lutzomyia longipalpis". *Parasitology* 124, 495-507
33. Walters L.L., Modi G.B., Chaplin G.L. & Tesh R.B. (1989) "Ultrastructural development of Leishmania chagasi in its vector, Lutzomyia longipalpis (Diptera: Psychodidae)". *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 41, 295-317
34. Lawyer P.G., Young D.G., Butler J.F. & Akin D.E. (1987) "Development of Leishmania mexicana in Lutzomyia diabolica and Lutzomyia shannoni (Diptera: Psychodidae)". *J.Med.Entomol.* 24, 347-355



35. Walters L.L., Modi G.B., Tesh R.B. & Burrage T. (1987) "Host-parasite relationship of *Leishmania mexicana mexicana* and *Lutzomyia abnottensis* (Diptera: Psychodidae)". *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 36, 294-314
36. Killick-Kendrick R., Molyneux D.H. & Ashford R.W. (1974) "Leishmania in phlebotomid sandflies. I. Modifications of the flagellum associated with attachment to the mid-gut and oesophageal valve of the sandfly". *Proc.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 187, 409-419
37. Warburg A., Hamada G.S., Schlein Y. & Shire D. (1986) "Scanning electron microscopy of *Leishmania major* in *Phlebotomus papatasi*". *Z.Parasitenkd.* 72, 423-431
38. Sacks D. & Noben-Trauth N. (2002) "The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice". *Nature* 2, 845-258
39. Lawyer P.G., Ngumbi P.M., Anjili C.O., Odongo S.O., Mebrahtu Y.B., Githure J.I., Koech D.K. & Roberts C.R. (1990) "Development of *Leishmania major* in *Phlebotomus duboscqi* and *Sergentomyia schwetzi* (Diptera: Psychodidae)". *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 43, 31-43
40. Lainson R. & Shaw J.J. (1978) "Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America". *Nature* 273, 595-600
41. Burchmore R.J. & Barrett M.P. (2001) "Life in vacuoles--nutrient acquisition by *Leishmania amastigotes*". *Int.J.Parasitol.* 31, 1311-1320
42. Antoine J.C., Prina E., Lang T. & Courret N. (1998) "The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages". *Trends Microbiol.* 6, 392-401
43. Rey L. (1991) in: ***Parasitos e Doenças Parasitárias do Homem nas Américas e na África*** (Anonymous Koogan S.A., Guanabara, pp. 731
44. Sereno D., Guilvard E., Maquaire S., Cavaleyra M., Holzmüller P., Ouassiss A. & Lemesre J.L. (2001) "Experimental studies on the evolution of antimony-resistant phenotype during the in vitro life cycle of *Leishmania infantum*: implications for the spread of chemoresistance in endemic areas". *Acta Trop.* 80, 195-205
45. Desjeux P. (2001) "Worldwide increasing risk factors for leishmaniasis". *Med.Microbiol.Immunol.(Berl)* 190, 77-79
46. Leandro C. & Campino L. (2003) "Leishmaniasis: efflux pumps and chemoresistance". *Int.J.Antimicrob.Agents* 22, 352-357
47. Bryceson A. (2001) "A policy for leishmaniasis with respect to the prevention and control of drug resistance". *Trop.Med.Int.Health* 6, 928-934
48. Ouellette M., Drummelsmith J. & Papadopoulou B. (2004) "Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments". *Drug Resist.Updat.* 7, 257-266
49. Guerin P.J., Olliaro P., Sundar S., Boelaert M., Croft S.L., Desjeux P., Wasunna M.K. & Bryceson A.D. (2002) "Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda". *Lancet Infect.Dis.* 2, 494-501

50. World Health Organization. Tropical disease research. 701. 1984.
51. Herwaldt B.L. & Berman J.D. (1992) "Recommendations for treating leishmaniasis with sodium stibogluconate (Pentostam) and review of pertinent clinical studies". *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 46, 296-306
52. Kamau S.W., Nunez R. & Grimm F. (2001) "Flow cytometry analysis of the effect of allopurinol and the dinitroaniline compound (Chloralin) on the viability and proliferation of *Leishmania infantum* promastigotes". *BMC.Pharmacol.* 1, 1
53. Delgado J., Macias J., Pineda J.A., Corzo J.E., Gonzalez-Moreno M.P., de la R.R., Sanchez-Quijano A., Leal M. & Lissen E. (1999) "High frequency of serious side effects from meglumine antimoniate given without an upper limit dose for the treatment of visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus type-1-infected patients". *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 61, 766-769
54. Faraut-Gambarelli F., Piarroux R., Deniau M., Giusiano B., Marty P., Michel G., Faugere B. & Dumon H. (1997) "In vitro and in vivo resistance of *Leishmania infantum* to meglumine antimoniate: a study of 37 strains collected from patients with visceral leishmaniasis". *Antimicrob.Agents Chemother.* 41, 827-830
55. Ouellette M., Legare D. & Papadopolou B. (1994) "Microbial multidrug-resistance ABC transporters". *Trends Microbiol.* 2, 407-411
56. Herwaldt B.L. (1999) "Miltefosine--the long-awaited therapy for visceral leishmaniasis?". *N.Engl.J.Med.* 341, 1840-1842
57. Jha T.K., Sundar S., Thakur C.P., Bachmann P., Karbwang J., Fischer C., Voss A. & Berman J. (1999) "Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian visceral leishmaniasis". *N.Engl.J.Med.* 341, 1795-1800
58. Le Fichoux Y., Rousseau D., Ferrua B., Ruet S., Lelievre A., Grousseau D. & Kubar J. (1998) "Short- and long-term efficacy of hexadecylphosphocholine against established *Leishmania infantum* infection in BALB/c mice". *Antimicrob.Agents Chemother.* 42, 654-658
59. Davidson R.N. (1998) "Practical guide for the treatment of leishmaniasis". *Drugs* 56, 1009-1018
60. Lira R., Sundar S., Makharia A., Kenney R., Gam A., Saraiva E. & Sacks D. (1999) "Evidence that the high incidence of treatment failures in Indian kala-azar is due to the emergence of antimony-resistant strains of *Leishmania donovani*". *J.Infect.Dis.* 180, 564-567
61. Sundar S. (2001) "Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis". *Trop.Med.Int.Health* 6, 849-854
62. Sundar S., Pai K., Kumar R., Pathak-Tripathi K., Gam A.A., Ray M. & Kenney R.T. (2001) "Resistance to treatment in Kala-azar: speciation of isolates from northeast India". *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 65, 193-196
63. Alvar J., Canavate C., Gutierrez-Solar B., Jimenez M., Laguna F., Lopez-Velez R., Molina R. & Moreno J. (1997) "*Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years". *Clin.Microbiol.Rev.* 10, 298-319

64. El On J., Halevy S., Grunwald M.H. & Weinrauch L. (1992) "Topical treatment of Old World cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major*: a double-blind control study". *J.Am.Acad.Dermatol.* 27, 227-231
65. Davidson R.N., di Martino L., Gradoni L., Giacchino R., Russo R., Gaeta G.B., Pempinello R., Scott S., Raimondi F., Cascio A. & . (1994) "Liposomal amphotericin B (AmBisome) in Mediterranean visceral leishmaniasis: a multi-centre trial". *Q.J.Med.* 87, 75-81
66. Lux H., Heise N., Klenner T., Hart D. & Oppendoes F.R. (2000) "Ether--lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether--lipid analogues in *Leishmania*". *Mol.Biochem.Parasitol.* 111, 1-14
67. Armson A., Kamau S.W., Grimm F., Reynoldson J.A., Best W.M., MacDonald L.M. & Thompson R.C. (1999) "A comparison of the effects of a benzimidazole and the dinitroanilines against *Leishmania infantum*". *Acta Trop.* 73, 303-311
68. Callahan H.L., Kelley C., Pereira T. & Grogl M. (1996) "Microtubule inhibitors: structure-activity analyses suggest rational models to identify potentially active compounds". *Antimicrob.Agents Chemother.* 40, 947-952
69. Katiyar S.K. & Edlind T.D. (1994) "Beta-tubulin genes of *Trichomonas vaginalis*". *Mol.Biochem.Parasitol.* 64, 33-42
70. Meloni B.P., Thompson R.C., Reynoldson J.A. & Seville P. (1990) "Albendazole: a more effective anti-giardial agent in vitro than metronidazole or tinidazole". *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* 84, 375-379
71. Chan M.M., Grogl M., Chen C.C., Bienen E.J. & Fong D. (1993) "Herbicides to curb human parasitic infections: in vitro and in vivo effects of trifluralin on the trypanosomatid protozoans". *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90, 5657-5661
72. Chan M.M., Grogl M., Callahan H. & Fong D. (1995) "Efficacy of the herbicide trifluralin against four P-glycoprotein-expressing strains of *Leishmania*". *Antimicrob.Agents Chemother.* 39, 1609-1611
73. Kayser O. & Kiderlen A.F. (2003) "Delivery strategies for antiparasitics". *Expert.Opin.Investig.Drugs* 12, 197-207
74. Kreuter J. (1996) "Nanoparticles and microparticles for drug and vaccine delivery". *J.Anat.* 189 ( Pt 3), 503-505
75. Barratt G.M. (2000) "Therapeutic applications of colloidal drug carriers". *Pharm.Sci.Technol.Today* 3, 163-171
76. Moreno J. & Alvar J. (2002) "Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model". *Trends Parasitol.* 18, 399-405
77. Alvar J., Canavate C., Molina R., Moreno J. & Nieto J. (2004) "Canine leishmaniasis". *Adv.Parasitol.* 57, 1-88
78. Fong D. & Chang K.P. (1981) "Tubulin biosynthesis in the developmental cycle of a parasitic protozoan, *Leishmania mexicana*: changes during differentiation of motile and nonmotile stages". *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 78, 7624-7628

79. Lofgren R. (1950) "The structure of *Leishmania tropica* as revealed by phase and electron microscopy". *J.Bacteriol.* 60, 617-625
80. Bordier C., Garavito R.M. & Armbruster B. (1982) "Biochemical and structural analyses of microtubules in the pellicular membrane of *Leishmania tropica*". *J.Protozool.* 29, 560-565
81. Wallach M., Fong D. & Chang K.P. (1982) "Post-transcriptional control of tubulin biosynthesis during leishmanial differentiation". *Nature* 299, 650-652
82. Fong D., Wallach M., Keithly J., Melera P.W. & Chang K.P. (1984) "Differential expression of mRNAs for alpha- and beta-tubulin during differentiation of the parasitic protozoan *Leishmania mexicana*". *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 81, 5782-5786
83. Landfear S.M. & Wirth D.F. (1984) "Control of tubulin gene expression in the parasitic protozoan *Leishmania enriettii*". *Nature* 309, 716-717
84. Bhaumik M., Das S. & Adhya S. (1991) "Evidence for translational control of beta-tubulin synthesis during differentiation of *Leishmania donovani*". *Parasitology* 103 Pt 2, 197-205
85. Birkett C.R., Parma A.E., Gerke-Bonet R., Woodward R. & Gull K. (1992) "Isolation of cDNA clones encoding proteins of complex structures: analysis of the *Trypanosoma brucei* cytoskeleton". *Gene* 110, 65-70
86. Downing K.H. & Nogales E. (1998) "Tubulin and microtubule structure". *Curr.Opin.Cell Biol.* 10, 16-22
87. Downing K.H. & Nogales E. (1998) "Tubulin structure: insights into microtubule properties and functions". *Curr.Opin.Struct.Biol.* 8, 785-791
88. Chan M.M. & Fong D. (1994) "Plant microtubule inhibitors against trypanosomatids". *Parasitol.Today* 10, 448-451
89. Devine M.D., Devine S.O. & Fedtke C. (1993) in: ***Physiology of Herbicide Action***, Prentice Hall, Nova Iorque,
90. Chan M.M., Tzeng J., Emge T.J., Ho C.T. & Fong D. (1993) "Structure-function analysis of antimicrotubule dinitroanilines against promastigotes of the parasitic protozoan *Leishmania mexicana*". *Antimicrob.Agents Chemother.* 37, 1909-1913
91. Upadhyaya M.K. & Noodén L.D. (1980) "Mode of Dinitroaniline Herbicide Action - II. Characterization of [<sup>14</sup>C]Oryzalin uptake and binding". *Plant.Physiol.* 66, 1048-1052
92. Chan M.M. & Fong D. (1990) "Inhibition of leishmanias but not host macrophages by the antitubulin herbicide trifluralin". *Science* 249, 924-926
93. Chan M.M., Triemer R.E. & Fong D. (1991) "Effect of the anti-microtubule drug oryzalin on growth and differentiation of the parasitic protozoan *Leishmania mexicana*". *Differentiation* 46, 15-21

94. Chan M.M. & Fong D. (1989) "Identification of a microtubule drug which differentially inhibits leishmania but not mammalian cell growth". *J.Cell.Biochem.* 13E, 130-135
95. Morrisette N.S., Mitra A., Sept D. & Sibley L.D. (2004) "Dinitroanilines bind alpha-tubulin to disrupt microtubules". *Mol.Biol.Cell* 15, 1960-1968
96. Benbow J.W., Bernberg E.L., Korda A. & Mead J.R. (1998) "Synthesis and evaluation of dinitroanilines for treatment of cryptosporidiosis". *Antimicrob.Agents Chemother.* 42, 339-343
97. Sharma A. & Sharma U.S. (1997) "Liposomes in Drug Delivery: Progress and Limitations". *Int.J.Pharm.* 154, 123-140
98. Grant G.J. & Bansinath M. (2001) "Liposomal delivery systems for local anesthetics". *Reg Anesth.Pain Med.* 26, 61-63
99. Malinovsky J.M., Benhamou D., Alafandy M., Mussini J.M., Coussaert C., Couarraze G., Pinaud M. & Legros F.J. (1997) "Neurotoxicological assessment after intracisternal injection of liposomal bupivacaine in rabbits". *Anesth.Analg.* 85, 1331-1336
100. Law S.L., Huang K.J. & Chiang C.H. (2000) "Acyclovir-containing liposomes for potential ocular delivery. Corneal penetration and absorption". *J.Control Release* 63, 135-140
101. Kotwani R.N., Gokhale P.C., Bodhe P.V., Kirodian B.G., Kshirsagar N.A. & Pandya S.K. (2002) "A comparative study of plasma concentrations of liposomal amphotericin B (L-AMP-LRC-1) in adults, children and neonates". *Int.J.Pharm.* 238, 11-15
102. Stuart D.D., Kao G.Y. & Allen T.M. (2000) "A novel, long-circulating, and functional liposomal formulation of antisense oligodeoxynucleotides targeted against MDR1". *Cancer Gene Ther.* 7, 466-475
103. Ehrlich P. (1906) in: *Collected studies on immunology*, Londres, pp. 404-442
104. Cammas S. & Kataoka K. (1996) in: *Solvents and Self-Organization of Polymers*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 83-113
105. Jankun J. (1994) in: *Targeting of Drugs 4. Advances in System Constructs*, Plenum Press, Nova Iorque, pp. 67-79
106. Chang T.M. (1964) "SEMIPERMEABLE MICROCAPSULES". *Science* 146, 524-525
107. Chang T.M. (1971) "The in vivo effects of semipermeable microcapsules containing L-asparaginase on 6C3HED lymphosarcoma". *Nature* 229, 117-118
108. Chang T.M. & Poznansky M.J. (1968) "Semipermeable microcapsules containing catalase for enzyme replacement in acatalasaemic mice". *Nature* 218, 243-245
109. Bangham A.D., Standish M.M. & Watkins J.C. (1965) "Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids". *J.Mol.Biol.* 13, 238-252
110. Sessa G. & Weissmann G. (1968) "Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes". *J.Lipid Res.* 9, 310-318

111. Kinne R., Da Cruz E. & Lin J.T. (1984) "Reconstitution of epithelial transport systems". *Kroc.Found.Ser.* 17, 309-325
112. Kinne R. & Cruz M.E.M. (1984) in: ***Current Topics in Membranes and Transport*** (Wade J.B. & Lewis S.A., eds.), Academic Press, pp. 245-258
113. Chapman D. (1975) "Phase transitions and fluidity characteristics of lipids and cell membranes". *Q.Rev.Biophys.* 8, 185-235
114. Sessa G. & Weissmann G. (1970) "Incorporation of lysozyme into liposomes. A model for structure-linked latency". *J.Biol.Chem.* 245, 3295-3301
115. Gregoriadis G. & Ryman B.E. (1971) "Liposomes as carriers of enzymes or drugs: a new approach to the treatment of storage diseases". *Biochem.J.* 124, 58P
116. Gregoriadis G. & Ryman B.E. (1972) "Lysosomal localization of fructofuranosidase-containing liposomes injected into rats. Some applications in the treatment of genetic disorders". *Biochem.J.* 129, 123-133
117. Gregoriadis G., Leathwood P.D. & Ryman B.E. (1971) "Enzyme entrapment in liposomes". *FEBS Lett.* 14, 95-99
118. Cruz, M. E. M. Lipossomas: vesículas mágicas ou simples utopia? Boletim de Biotecnologia (58), 3-16. 1997. Lisboa, Boletim da Sociedade Portuguesa de Biotecnologia.
119. Semple S.C., Harasym T.O., Clow K.A., Ansell S.M., Klimuk S.K. & Hope M.J. (2005) "Immunogenicity and rapid blood clearance of liposomes containing polyethylene glycol-lipid conjugates and nucleic Acid". *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 312, 1020-1026
120. Posner R. (2002) "Liposomes". *J.Drugs Dermatol.* 1, 161-164
121. Kasa P., Jr., Gyemant A. & Kata M. (1995) "[Preparation and investigation of liposomes]". *Acta Pharm.Hung.* 65, 57-59
122. Nesyтова N.I., Paleva N.S., Il'ina E.V., Shenk P., Bendas F. & Nun P. (1990) "[Trends in the development of research in the field of liposomes (review of patent literature)]". *Vestn.Akad.Med.Nauk SSSR* 8-19
123. Betz G., Aeppli A., Menshutina N. & Leuenberger H. (2005) "In vivo comparison of various liposome formulations for cosmetic application 1". *Int.J.Pharm.* 296, 44-54
124. Meyerhoff A. (1999) "U.S. Food and Drug Administration approval of AmBisome (liposomal amphotericin B) for treatment of visceral leishmaniasis". *Clin.Infect.Dis.* 28, 42-48
125. Lichtenberg D. & Barenholz Y. (1988) "Liposomes: preparation, characterization, and preservation". *Methods Biochem.Anal.* 33, 337-462
126. Frezard F. (1999) "Liposomes: from biophysics to the design of peptide vaccines". *Braz.J.Med.Biol.Res.* 32, 181-189
127. Gregoriadis G. (1988) in: ***Liposomes as Drug Carriers: Recent Trends and Progress***, John Wiley and Sons, Chichester,

128. Gregoriadis G. (1984) in: ***Liposome Technology***, CRC Press, Boca Raton, Florida,
129. Mayer L.D., Bally M.B., Hope M.J. & Cullis P.R. (1986) "Techniques for encapsulating bioactive agents into liposomes". *Chem.Phys.Lipids* 40, 333-345
130. Jain M.S. (1988) in: ***Introduction to Biological Membranes***, Wiley , Nova Iorque,
131. Gaspar, M. M. Liposomal Formulations of Rifabutin and Acylated Superoxide Dismutase. 1-43. 2004. Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.
132. Sharata H.H. & Katz K.H. (1996) "Liposomes". *Int.J.Dermatol.* 35, 761-769
133. Lehninger A.L., Nelson D.L. & Cox M.M. (1993) in: ***Principles of Biochemistry***, Worth Pub., Nova Iorque, pp. 674-680
134. Barbosa, C. Desenvolvimento e Caracterização de Formulações Lipossômicas de Monofosfato de Vidarabina para o Tratamento da Hepatite B Crônica. 19-53. 1995. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.
135. New R.R.C. (1990) in: ***Liposomes: a practical approach***, IRL Press, Oxford University Press, Nova Iorque,
136. Crommelin D.J. & Schreier H. (1994) in: ***Colloidal Drug Delivery Systems*** (Kreuter J., ed.), Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, pp. 73-190
137. Lasic D.D. (1997) in: ***Liposomes in Gene Delivery*** (Lasic D.D., ed.), CRC Press, Boca Raton, Nova Iorque, pp. 67-112
138. Ranade V.V. (1989) "Drug delivery systems. 1. site-specific drug delivery using liposomes as carriers". *J.Clin.Pharmacol.* 29, 685-694
139. Fielding R.M. (1991) "Liposomal drug delivery. Advantages and limitations from a clinical pharmacokinetic and therapeutic perspective". *Clin.Pharmacokinet.* 21, 155-164
140. Cruz, M. E. M. Aplicações Industriais de Lipossomas: Que Perspectivas? Futuro, Ano III 27, 40-43. 1989.
141. Constantino L., Cruz M.E.M., Mehta R.T. & Lopez-Berestein G. (1993) "Formulation, and Toxicity of Liposomes Containing Rifampicin". *J.Liposome Res.* 3, 275-301
142. Barenholz Y. & Crommelin D.J. (1994) in: ***Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*** (Swarbrick J. & Boylan J.C., eds.), Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, pp. 1-39
143. Sousa, A. C. Preparação e Caracterização de Formulações Lipossomais de Trifluralina para Tratamento de Leishmaniose. 1-26. 2002. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia.
144. Betageri G.V., Jenkins S.A. & Parsons D.L. (1993) in: ***Liposome Drug Delivery Systems***, Technomic Publishing Company, Inc., E.U.A.,
145. Cullis P.R., Hope M.J., Bally M.B., Madden T.D., Mayer L.D. & Janoff A.S. (1987) in: ***Liposomes from Biophysics to Therapeutics*** (Ostro M.J., ed.), Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, pp. 39-72

146. Patel H.M. (1992) "Serum opsonins and liposomes: their interaction and opsonophagocytosis". *Crit Rev.Ther.Drug Carrier Syst.* 9, 39-90
147. Cullis P.R., Chonn A. & Semple S.C. (1998) "Interactions of liposomes and lipid-based carrier systems with blood proteins: Relation to clearance behaviour in vivo". *Adv.Drug Deliv.Rev.* 32, 3-17
148. Gregoriadis G. (1995) "Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems". *Trends Biotechnol.* 13, 527-537
149. Crommelin D.J. & Storm G. (1995) in: ***Liposomes, New Systems and New Trends in their Applications*** (Puisieux F., Couvreur P., Delatre J. & Devissaguet J.P., eds.), Éditions de Santé, Paris, pp. 767-781
150. Blume G. & Cevc G. (1990) "Liposomes for the sustained drug release in vivo". *Biochim.Biophys.Acta* 1029, 91-97
151. Klibanov A.L., Maruyama K., Torchilin V.P. & Huang L. (1990) "Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes". *FEBS Lett.* 268, 235-237
152. Papahadjopoulos D., Allen T.M., Gabizon A., Mayhew E., Matthay K., Huang S.K., Lee K.D., Woodle M.C., Lasic D.D., Redemann C. & . (1991) "Sterically stabilized liposomes: improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy". *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88, 11460-11464
153. Senior J., Delgado C., Fisher D., Tilcock C. & Gregoriadis G. (1991) "Influence of surface hydrophilicity of liposomes on their interaction with plasma protein and clearance from the circulation: studies with poly(ethylene glycol)-coated vesicles". *Biochim.Biophys.Acta* 1062, 77-82
154. Klibanov A.L. & Huang L. (1992) "Long circulating liposomes: Development and perspectives". *J.Liposome Res.* 2, 321-334
155. Papahadjopoulos D. (1995) in: ***Stealth Liposomes*** (Lasic D.D., ed.), CRC Press, Boca Raton, Londres, pp. 1-6
156. Chonn A., Semple S.C. & Cullis P.R. (1992) "Association of blood proteins with large unilamellar liposomes in vivo. Relation to circulation lifetimes". *J Biol.Chem.* 267, 18759-18765
157. Woodle M.C. & Lasic D.D. (1992) "Sterically stabilized liposomes". *Biochim.Biophys.Acta* 1113, 171-199
158. Allen T.M. (1992) "Stealth liposomes: Fine years on". *J.Liposome Res.* 2, 289-305
159. Lasic D.D. (1997) "Recent developments in medical applications of liposomes: sterically stabilized liposomes in cancer therapy and gene delivery *in vivo*". *J.Control Release* 48, 203-222
160. Barbet J. (1995) in: ***Liposomes, New Systems and New Trends in their Applications*** (Puisieux F., Couvreur P., Delatre J. & Devissaguet J.P., eds.), Éditions de Santé, Paris, pp. 157-191



161. Holmberg E., Maruyama K., Litzinger D.C., Wright S., Davis M., Kabalka G.W., Kennel S.J. & Huang L. (1989) "Highly efficient immunoliposomes prepared with a method which is compatible with various lipid compositions". *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 165, 1272-1278
162. Mukherjee S., Das L., Kole L., Karmakar S., Datta N. & Das P.K. (2004) "Targeting of parasite-specific immunoliposome-encapsulated doxorubicin in the treatment of experimental visceral leishmaniasis". *J.Infect.Dis.* 189, 1024-1034
163. Felgner P.L., Gadek T.R., Holm M., Roman R., Chan H.W., Wenz M., Northrop J.P., Ringold G.M. & Danielsen M. (1987) "Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure". *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 84, 7413-7417
164. Maurer N., Fenske D.B. & Cullis P.R. (2001) "Developments in liposomal drug delivery systems". *Expert.Opin.Biol.Ther.* 1, 923-947
165. Santos, N. C. and Castanho, M. A. Lipossomas: a bala mágica acertou? *Quim.Nova* 25(6B), 1181-1185. 2002.
166. Sunamoto J. & Iwamoto K. (1986) "Protein-coated and polysaccharide-coated liposomes as drug carriers". *Crit Rev.Ther.Drug Carrier Syst.* 2, 117-136
167. Bagatolli L.A. & Gratton E. (2000) "A correlation between lipid domain shape and binary phospholipid mixture composition in free standing bilayers: A two-photon fluorescence microscopy study". *Biophys.J.* 79, 434-447
168. Woodle M.C. & Papahadjopoulos D. (1989) "Liposome preparation and size characterization". *Methods Enzymol.* 171, 193-217
169. <http://www.avantilipids.com/PreparationOfLiposomes.html> (2005)
170. Liu F., Sugar I.P. & Chong P.L. (1997) "Cholesterol and ergosterol superlattices in three-component liquid crystalline lipid bilayers as revealed by dehydroergosterol fluorescence". *Biophys.J.* 72, 2243-2254
171. Castanho M.A., Prieto M. & Jameson D.M. (1999) "The pentaene macrolide antibiotic filipin prefers more rigid DPPC bilayers: a fluorescence pressure dependence study". *Biochim.Biophys.Acta* 1419, 1-14
172. Torchilin V.P. & Weissig V. (2003) in: ***Liposomes: a practical approach***, Oxford University Press, Inc., Nova Iorque,
173. Elorza B., Elorza M.A., Sainz M.C. & Chantres J.R. (1993) "Comparison of particle size and encapsulation parameters of three liposomal preparations". *J.Microencapsul.* 10, 237-248
174. Hope M.J., Bally M.B., Webb G. & Cullis P.R. (1985) "Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential". *Biochim.Biophys.Acta* 812, 55-65
175. Mayer L.D., Hope M.J. & Cullis P.R. (1986) "Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure". *Biochim.Biophys.Acta* 858, 161-168

176. Cruz, M. E. M., Gaspar, M. M., Lopes, F., Jorge, J. S., and Perez-Soler, R. Liposomal L-asparaginase: in vitro evaluation. *International Journal of Pharmaceutics* 96, 67-77. 1993.
177. Kirby C.J. & Gregoriadis G. (1984) "Dehydration - Rehydration vesicles: a simple method for high yield drug entrapment in liposomes". *Biotechnology* 2, 979-984
178. Alino S.F., Garcia-Sanz M., Irruarrizaga A., Alfaro J. & Hernandez J. (1990) "High encapsulation efficiencies in sized liposomes produced by extrusion of dehydration-rehydration vesicles". *J.Microencapsul.* 7, 497-503
179. Cullis P.R., Fenske D.B. & Hope M.J. (1996) in: **Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes** (Vance D.E. & Vance J., eds.), Elsevier, Amesterdão, pp. 1-33
180. De Gier J., Mandersloot J.G. & van Deenen L.L. (1968) "Lipid composition and permeability of liposomes". *Biochim.Biophys.Acta* 150, 666-675
181. Szoka F., Jr. & Papahadjopoulos D. (1980) "Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes)". *Annu.Rev.Biophys.Bioeng.* 9, 467-508
182. Cevc G. (1984) in: **Liposome Technology** (Gregoriadis G., ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 1-36
183. Heimburg T. (2000) "A model for the lipid pretransition: coupling of ripple formation with the chain-melting transition". *Biophys.J.* 78, 1154-1165
184. Cevc G. (1993) "Electrostatic characterization of liposomes". *Chem.Phys.Lipids* 64, 163-186
185. Ahsan F., Rivas I.P., Khan M.A. & Torres Suarez A.I. (2002) "Targeting to macrophages: role of physicochemical properties of particulate carriers--liposomes and microspheres--on the phagocytosis by macrophages". *J.Control Release* 79, 29-40
186. Papahadjopoulos D., Cowden M. & Kimelberg H. (1973) "Role of cholesterol in membranes. Effects on phospholipid-protein interactions, membrane permeability and enzymatic activity". *Biochim.Biophys.Acta* 330, 8-26
187. Demel R.A. & De Kruffyff B. (1976) "The function of sterols in membranes". *Biochim.Biophys.Acta* 457, 109-132
188. Talsma H., van Steenberg M.J., Salemink P.J. & Crommelin D.J. (1991) "The cryopreservation of liposomes. 1. A differential scanning calorimetry study of the thermal behavior of a liposome dispersion containing mannitol during freezing/thawing". *Pharm.Res.* 8, 1021-1026
189. Talsma H., van Steenberg M.J. & Crommelin D.J. (1992) "The cryopreservation of liposomes. 2. Effect of particle size on crystallization behavior and marker retention". *Cryobiology* 29, 80-86
190. Talsma H., Cherng J., Lehrmann H., Kursu M., Ogris M., Hennink W.E., Cotten M. & Wagner E. (1997) "Stabilization of gene delivery systems by freeze-drying". *Int.J.Pharm.* 157, 233-238

191. Winterhalter M. & Lasic D.D. (1993) "Liposome stability and formation: experimental parameters and theories on the size distribution". *Chem.Phys.Lipids* 64, 35-43
192. Frokjaer S., Hjorth E.L. & Worts O. (1984) in: **Liposome Technology** (Gregoriadis G., ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 235-245
193. Gennis R.B. (1989) in: **Biomembranes: Molecular Structure and Function**, Springer-Verlag, Nova Iorque,
194. Chow C.Y. & Heath T.D. (1995) "Rapid diffusion of the lipid phosphorus of phosphatidylglycerol liposomes through polycarbonate membranes is caused by the oxidation of the unsaturated fatty acids". *Biochim.Biophys.Acta* 1239, 168-176
195. Hunt C.A. & Tsang S. (1981) "Alfa-tocopherol retards auto-oxidation and prolongs the shelf-life of liposomes". *Int.J.Pharm.* 8, 101-110
196. Lambelet P. & Loliger J. (1984) "The fate of antioxidant radicals during lipid autooxidation. I. The tocopheroxyl radicals". *Chem.Phys.Lipids* 35, 185-198
197. Nikolelis D.P. & Mitrokotsa M. (2002) "Stabilized lipid film based biosensor for atenolol". *Biosens.Bioelectron.* 17, 565-572
198. Crommelin D.J., Talsma H., Grit M. & Zuidam N.J. (1993) in: **Phospholipids Handbook** (Cevc G., ed.), Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, pp. 335-348
199. Snabe T. & Petersen S.B. (2003) "Lag phase and hydrolysis mechanisms of triacylglycerol film lipolysis". *Chem.Phys.Lipids* 125, 69-82
200. Kates M. & Kushwaha S.C. (1976) in: **Lipids**, Raven Press, Nova Iorque, pp. 267-290
201. Bali A., Dhawan S. & Gupta C.M. (1983) "Stability of liposomes in circulation is markedly enhanced by structural modification of their phospholipid component". *FEBS Lett.* 154, 373-377
202. Agarwal K., Bali A. & Gupta C.M. (1986) "Influence of the phospholipid structure on the stability of liposomes in serum". *Biochim.Biophys.Acta* 856, 36-40
203. Weiner A. (1990) in: **Targeted Therapeutic Systems** (Tyle P. & Ram B., eds.), Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, pp. 305-336
204. Weinstein J. & Leserman L. (1984) "Liposomes as drug carriers in cancer chemotherapy". *Pharmac.Ther.* 24, 207-233
205. Sandra A. & Pagano R.E. (1979) "Liposome-cell interactions. Studies of lipid transfer using isotopically asymmetric vesicles". *J.Biol.Chem.* 254, 2244-2249
206. Arvinte T., Hildenbrand K., Wahl P. & Nicolau C. (1986) "Lysozyme-induced fusion of liposomes with erythrocyte ghosts at acidic pH". *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 83, 962-966
207. Arvinte T., Wahl P. & Nicolau C. (1987) "Low pH fusion of mouse liver nuclei with liposomes bearing covalently bound lysozyme". *Biochim.Biophys.Acta* 899, 143-150

208. Sunamoto J., Akiyoshi K., Tanaka K. & Sato T. (1990) "Newly developed fusogenic liposome". *Polymer Preprints* 31, 155-156
209. Wheeler C.J., Felgner P.L., Tsai Y.J., Marshall J., Sukhu L., Doh S.G., Hartikka J., Nietupski J., Manthorpe M., Nichols M., Plewe M., Liang X., Norman J., Smith A. & Cheng S.H. (1996) "A novel cationic lipid greatly enhances plasmid DNA delivery and expression in mouse lung 1". *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93, 11454-11459
210. Daemen T., De Haan A., Arkema A. & Wilschut J. (1998) in: ***Medical Applications of Liposomes*** (Lasic D.D. & Papahadjopoulos D., eds.), Elsevier Science, Amesterdão, pp. 117-163
211. Gould-Fogerite S. & Mannino R. (1993) in: ***Liposome Technology*** (Gregoriadis G., ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 261-276
212. Hofland, H. E. J., Goyal, K., and Huang, L. Inhibition of Proto-Oncogene Expression by Liposome Mediated Transfer of Ribozyme Expression Vectors into Human Ovarian Carcinoma Cells. D-4. 1994. Vancouver, Canada. 3<sup>rd</sup> Liposome Research Days Conference - Liposomes: The Next Generation.
213. Gao X.A. & Huang L. (1991) "A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells". *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 179, 280-285
214. Corvo, M. L., Martins, M. B. F., Francisco, A. P., Morais, J. G., and Cruz, M. E. M. Liposomal formulations of Cu,Zn-superoxide dismutase: physico-chemical characterization and activity assessment in an inflammation model. *J.Control.Release* 43, 1-8. 1997.
215. Corvo, M. L., Jorge, J. C. S., van't Hof, R., Cruz, M. E. M., Crommelin, D. J. A., and Storm, G. Superoxide dismutase entrapped in long-circulating liposomes: formulation design and therapeutic activity in rat adjuvant arthritis. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes* 1564(1), 227-236. 19-8-2002.
216. Rouser G., Flusher S. & Yamamoto A. (1970) "Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots". *Lipids* 5, 494-496
217. Pinhal, A., Mota, D., Carvalheiro, M., and Cruz, M. E. Liposomal Formulations of Dinitroanilines: Trifluralin and Oryzalin. Morais, J. A. 2(Sociedade Portuguesa de Ciências Farmacêuticas), 127-128. 2005. Coimbra, Ordem dos farmacêuticos. 2<sup>nd</sup> Congress of the Portuguese Society of Pharmaceutical Sciences and 6<sup>th</sup> Congress of the Portuguese - Spanish Chapter of the Controlled Release Society.
218. Stauber L.A. (1958) "Host resistance to the Kartoum strain of *Leishmania donovani*". *Rice Inst.Pamphlets* 45, 80-83
219. Buffet P.A., Sulahian A., Garin Y.J., Nassar N. & Derouin F. (1995) "Culture microtitration: a sensitive method for quantifying *Leishmania infantum* in tissues of infected mice". *Antimicrob.Agents Chemother.* 39, 2167-2168
220. Riça-Capela M.J., Cortes S., Leandro C., Peleteiro M.C., Santos-Gomes G. & Campino L. (2003) "Immunological and histopathological studies in a rodent model infected

with *L.infantum* promastigotes or amastigotes". *Parasitology Research* 89, 163-169

221. Gangneux J.P., Sulahian A., Garin Y.J.F., Farinotti R. & Derouin F. (1996) "Therapy of visceral leishmaniasis due to *L. infantum*: experimental assesment of efficacy of Ambisome". *Antimicrob.Agents Chemother.* 40, 1214-1218
222. Cruz, M. E., Carvalheiro, M., and Jorge, J. C. Formulações Lipossomais de dinitroanilinas e processo para a sua preparação. (102197). 12-4-1998. Instituto Nacional da Propriedade Industrial, Portugal.
223. Cruz, M. E., Carvalheiro, M., and Jorge, J. C. Dinitroaniline liposomal formulations and processes for their preparation. (1.030.653). 12-4-1998. Europe.
224. Hsu M.J. & Juliano R.L. (1982) "Interactions of liposomes with the reticuloendothelial system. II: Nonspecific and receptor-mediated uptake of liposomes by mouse peritoneal macrophages". *Biochim.Biophys.Acta* 720, 411-419
225. Raz A., Bucana C., Fogler W.E., Poste G. & Fidler I.J. (1981) "Biochemical, morphological, and ultrastructural studies on the uptake of liposomes by murine macrophages". *Cancer Res.* 41, 487-494
226. Heath T.D., Lopez N.G. & Papahadjopoulos D. (1985) "The effects of liposome size and surface charge on liposome-mediated delivery of methotrexate-gamma-aspartate to cells in vitro". *Biochim.Biophys.Acta* 820, 74-84
227. Greenspan P., Ryu B.H., Mao F. & Gutman R.L. (1995) "Association of negatively-charged phospholipids with low-density lipoprotein (LDL) increases its uptake and the deposition of cholesteryl esters by macrophages". *Biochim.Biophys.Acta* 1257, 257-264
228. Daemen T., Velinova M., Regts J., de Jager M., Kalicharan R., Donga J., van der Want J.J. & Scherphof G.L. (1997) "Different intrahepatic distribution of phosphatidylglycerol and phosphatidylserine liposomes in the rat". *Hepatology* 26, 416-423
229. Kamps J.A. & Scherphof G.L. (2004) "Biodistribution and uptake of liposomes in vivo". *Methods Enzymol.* 387, 257-266
230. Gerrit L., Scherphof G.L. & Kamps J.A. (2001) "The role of hepatocytes in the clearance of liposomes from the blood circulation". *Progress in Lipid Research* 40, 149-166
231. Scherphof G.L., Romero E.L., Velinova M., Kamps J.A., Koning G.A., Meijer D.K., Swart P. & Daemen T. (1999) in: *Cells of the hepatic Sinusoid* (Wisse E., Knook D.L., de Zanger R. & Fraser R., eds.), Kupffer Cell Foundation, Leiden, Holanda, pp. 73-77
232. Scherphof G.L., Velinova M., Kamps J.A., Donga J., van der Want H., Kuipers F., Havekes L. & Daemen T. (1997) "Modulation of pharmacokinetic behavior of liposomes". *Adv.Drug Deliv.Rev.* 24, 179-191
233. Janicki S., Jankowski J., Szulc J., Woyczkowski B. & Sznitowska M. (2002) "The effect of cryoprotectants on the physical properties of large liposomes containing sodium diclofenac". *Acta Pol.Pharm.* 59, 187-191

234. Drug Delivery Technology (2005)
235. Glavas-Dodov M., Fredro-Kumbaradzi E., Goracinova K., Simonoska M., Calis S., Trajkovic-Jolevska S. & Hincal A.A. (2005) "The effects of lyophilization on the stability of liposomes containing 5-FU". *Int.J.Pharm.* 291, 79-86
236. Cruz M.E., Corvo M.L., Jorge J.C. & Lopes F. (1989) in: ***Liposomes in the Therapy of Infectious Diseases and Cancer*** (Lopez-Berestein G. & Fidler I.J., eds.), Alan R. Liss, Inc., Nova Iorque, pp. 417-426
237. Barbosa C. & Cruz M.E. (1995) "Lipossomas de vidarabina: estudos preliminares do desenvolvimento de formulações". *Rev.Port.Farm.* 4, 161-173
238. Hope M.J., Bally M.B., Mayer L.D., Janoff A.S. & Cullis P.R. (1986) "Generation of multilamellar and unilamellar phospholipid vesicles". *Chem.Phys.Lipids* 40, 89-107
239. Immordino M.L., Brusa P., Arpicco S., Stella B., Dosio F. & Cattel L. (2003) "Preparation, characterization, cytotoxicity and pharmacokinetics of liposomes containing docetaxel". *J.Control Release* 91, 417-429
240. Kimelberg H.K. & Papahadjopoulos D. (1971) "Phospholipid-protein interactions: membrane permeability correlated with monolayer "penetration"". *Biochim.Biophys.Acta* 233, 805-809
241. Kimelberg H.K. (1976) "Protein-liposome interactions and their relevance to the structure and function of cell membranes". *Mol.Cell Biochem.* 10, 171-190
242. Papahadjopoulos D., Moscarello M., Eylar E.H. & Isac T. (1975) "Effects of proteins on thermotropic phase transitions of phospholipid membranes". *Biochim.Biophys.Acta* 401, 317-335
243. Kitagawa T., Inoue K. & Nojima S. (1976) "Effect of albumin and methylated albumin on the glucose permeability of lipid membranes". *J.Biochem.(Tokyo)* 79, 1135-1145
244. Hoekstra D. & Scherphof G. (1979) "Effect of fetal calf serum and serum protein fractions on the uptake of liposomal phosphatidylcholine by rat hepatocytes in primary monolayer culture". *Biochim.Biophys.Acta* 551, 109-121
245. Yokouchi Y., Tsunoda T., Imura T., Yamauchi H., Yokoyama S., Sakai H. & Abe M. (2001) "Effect of adsorption of bovine serum albumin on liposomal membrane characteristics". *Colloids Surf.B Biointerfaces.* 20, 95-103
246. Lebed' O.I., Primak R.G. & Tishchenko R.I. (1989) "[Complexing of bovine serum albumin with phosphatidyl choline liposomes]". *Ukr.Biokhim.Zh.* 61, 101-106
247. Law, S. L., Lo, W. Y., Pai, S. H., Teh, G. W., and Kou, F. Y. The absorption of bovine serum albumin by liposomes. *International Journal of Pharmaceutics* 32, 237-241. 1986.
248. Hunt C.A. (1982) "Liposomes disposition in vivo. V. Liposome stability in plasma and implications for drug carrier function". *Biochim.Biophys.Acta* 719, 450-463

249. Hernandez-Caselles T., Villalain J. & Gomez-Fernandez J.C. (1993) "Influence of liposome charge and composition on their interaction with human blood serum proteins". *Mol.Cell Biochem.* 120, 119-126
250. Sweet, C. and Zull, J. E. The binding of serum albumin to phospholipid liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta* 219, 253-262. 1970.
251. Barak E., Amin-Spector S., Gerliak E., Goyard S., Holland N. & Zilberstein D. (2005) "Differentiation of *Leishmania donovani* in host-free system: analysis of signal perception and response". *Mol.Biochem.Parasitol.* 141, 99-108
252. Gupta A.K., Narayan S., Sharma M.C., Saran R. & Kar S.K. (1999) "Effects of elevated temperature and lower pH on infectivity of *Leishmania donovani* promastigotes". *J.Communit.Dis.* 31, 257-259
253. Garlapati S., Dahan E. & Shapira M. (1999) "Effect of acidic pH on heat shock gene expression in *Leishmania*". *Mol.Biochem.Parasitol.* 100, 95-101
254. Chakravarty R., Sharma M.C., Gupta A.K., Prakash N. & Saran R. (1994) "*Leishmania donovani*: hemolytic activity of promastigotes". *Exp.Parasitol.* 78, 253-258
255. Vieira L.L., Sacerdoti-Sierra N. & Jaffe C.L. (2002) "Effect of pH and temperature on protein kinase release by *Leishmania donovani*". *Int.J.Parasitol.* 32, 1085-1093
256. Crocker P.R., Blackwell J.M. & Bradley D.J. (1984) "Expression of the natural resistance gene *Lsh* in resident liver macrophages". *Infect.Immun.* 43, 1033-1040
257. Bradley D.J. (1982) "Genetics of resistance to infection with special reference to leishmaniasis. Introduction, and genetics of susceptibility to *Leishmania donovani*". *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* 76, 143-146
258. Desjeux, P. *Leishmania/HIV co-infection in south western europe 1990 - 1998. Retrospective analysis of 965 cases.* 2002. Communicable Diseases Surveillance and Response (CSR).
259. Shah S.P. & Misra A. (2004) "Development of liposomal amphotericin B dry powder inhaler formulation". *Drug Deliv.* 11, 247-253
260. Lin Z.F., Zeng K., Zhou Z.G., Li G.F., Xie F.M., Zhu X.L. & Zhang S.Q. (2004) "[Preparation and characterization of podophyllotoxin-dipalmitoylphosphatidylcholine proliposome]". *Di Yi.Jun.Yi.Da.Xue.Xue.Bao.* 24, 784-6, 788
261. Joshi M.R. & Misra A. (2001) "Liposomal budesonide for dry powder inhaler: preparation and stabilization". *AAPS.PharmSciTech.* 2, 25





## **VII. - ANEXOS**

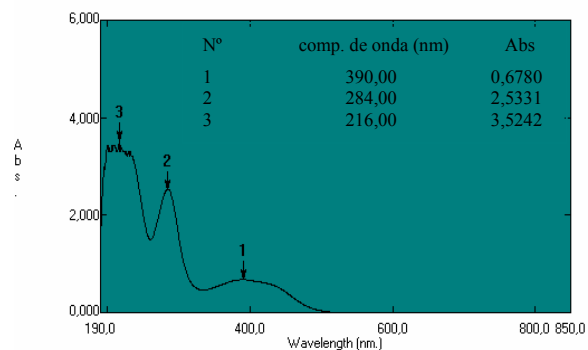


## ANEXO I

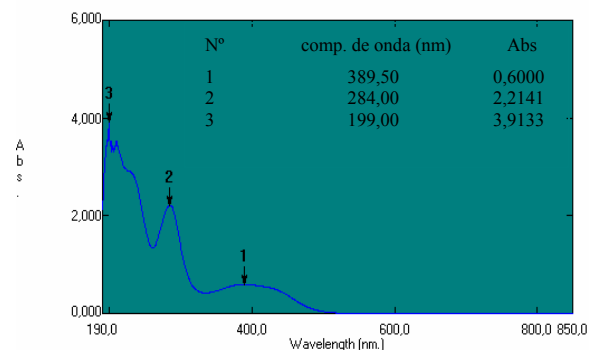
A otimização do método de doseamento de ORZ foi dividida em duas fases.

Numa primeira fase, prepararam-se várias soluções para a realização de espectros de absorvância (alguns deles já foram evidenciados na parte experimental em 2.2.1):

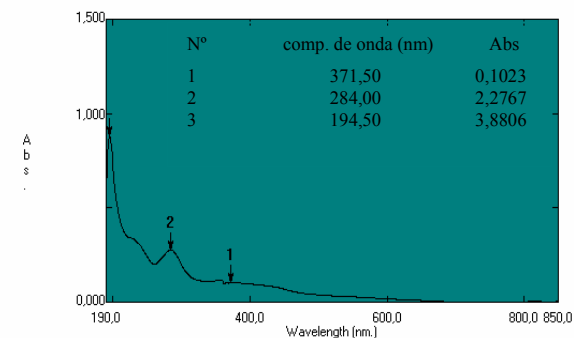
1. Solução stock de ORZ 50  $\mu\text{g/mL}$  dissolvida em acetonitrilo 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) (**Figura VII. 1.A.**);
2. Solução stock de ORZ 50  $\mu\text{g/mL}$  dissolvida em acetonitrilo (**Figura VII. 1.B.**);
3. Diluição (1/10) das duas soluções stock, obtendo-se duas soluções de ORZ com uma concentração de 5  $\mu\text{g/mL}$  (concentração teórica doseada após diluição de 1/60 de uma concentração de 1  $\mu\text{mol/mL}$ , usada na preparação dos lipossomas de PC:PG com uma razão molar 4:1);
4. Lipossomas vazios (lipossomas com uma concentração de lípido total de 10  $\mu\text{mol/mL}$  diluídos 1/60);
5. Solução com razão 60% acetonitrilo + 40% água desmineralizada ( $\text{H}_2\text{O}_d$ ) (**Figura VII. 1.D.**);
6. Solução com razão 60% acetonitrilo 0,1% TFA + 40%  $\text{H}_2\text{O}_d$  0,1% TFA (**Figura VII. 1.E.**);
7. Solução com razão 40% acetonitrilo + 60%  $\text{H}_2\text{O}_d$  (**Figura VII. 1.F.**);
8. Solução com razão 20% acetonitrilo + 80%  $\text{H}_2\text{O}_d$ .



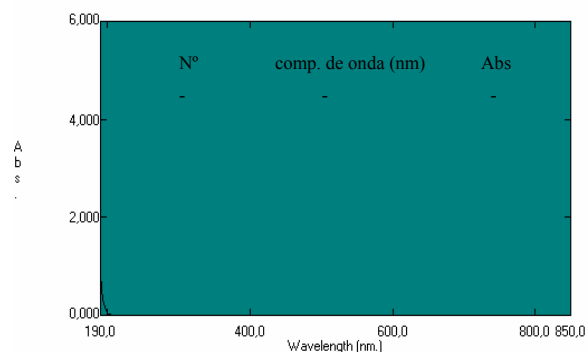
**A.** - Espectro da solução preparada em 1.



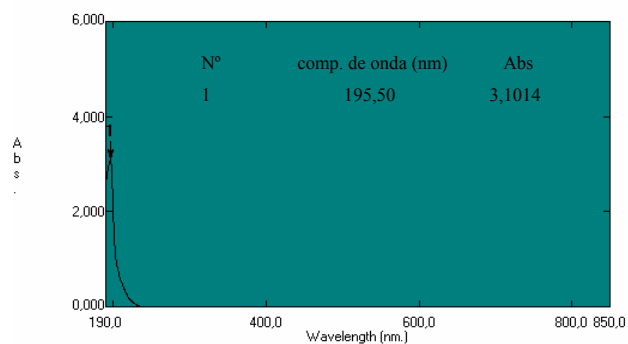
**B.** - Espectro da solução preparada em 2.



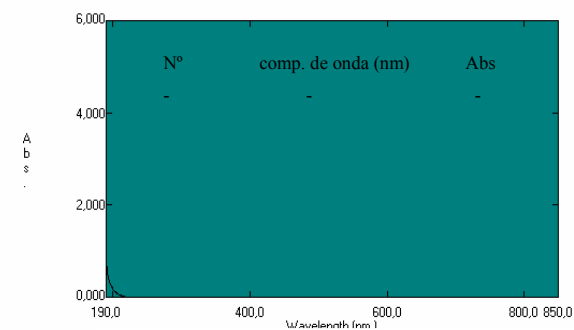
**C.** - Espectro da solução de ORZ com uma concentração de 5 µg/mL (dissolvida em acetonitrilo com 0,1% de TFA).



**D.** - Espectro da solução preparada em 5.



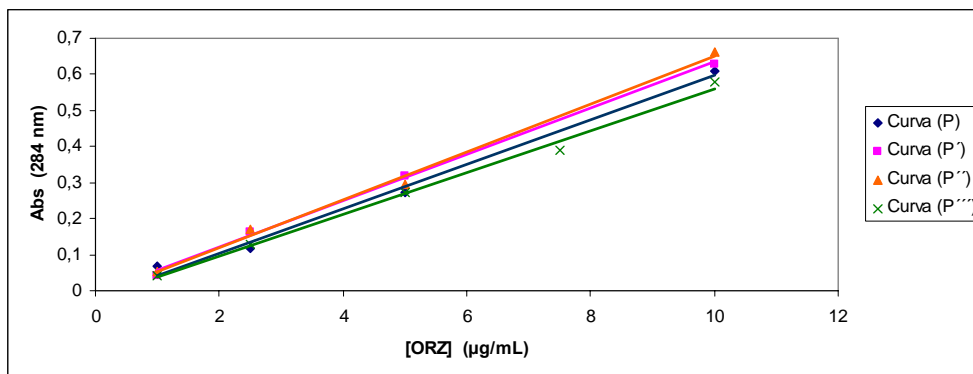
**E.** - Espectro da solução preparada em 6.



**F.** - Espectro da solução preparada em 7.

**Figura VII. 1.** - Espectros de absorção de diferentes soluções, obtidos por varrimento de comprimento de onda entre 190 e 850nm, em diferentes condições experimentais.

Numa segunda fase, efectuaram-se diferentes curvas padrão com diferentes concentrações de acetonitrilo, estudando o efeito da presença de ácido trifluoroacético (TFA) e lipossomas vazios na leitura das absorvâncias. As curvas padrão foram preparadas pelo método descrito na parte experimental em 2.2.1. De seguida serão apresentados os gráficos das curvas, com e sem lipossomas vazios, e o tratamento estatístico dos resultados obtidos.



**Figura VII. 2** - Curvas padrão de ORZ com diferentes concentrações de acetonitrilo na presença ou ausência de TFA..

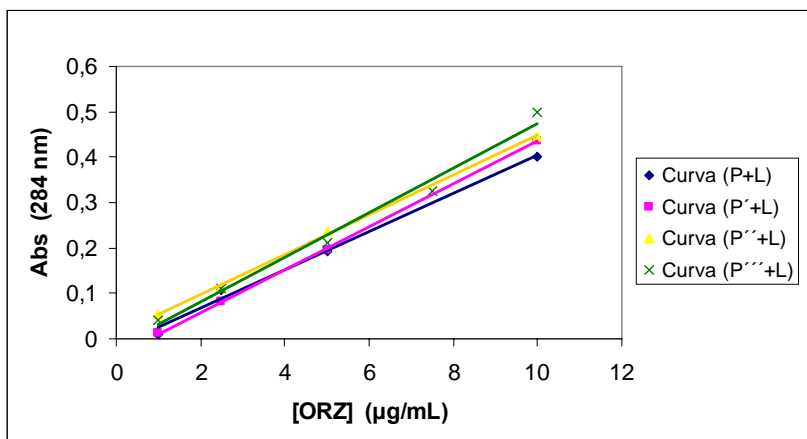
Curva (P): curva padrão de ORZ com 60% A e 40% B com 0,1% de TFA;

Curva(P'): curva padrão de ORZ com 60% A e 40% B;

Curva(P''): curva padrão de ORZ com 40% A e 60% B;

Curva(P'''): curva padrão de ORZ com 20% A e 80% B;

A – acetonitrilo; B – água desmineralizada; L – lipossomas vazios



**Figura VII. 3** - Curvas padrão de ORZ com diferentes concentrações de acetonitrilo na presença de lipossomas vazios.

Curva (P + L): curva padrão de ORZ com 60% A e 40% B com 0,1% de TFA;

Curva(P' + L): curva padrão de ORZ com 60% A e 40% B;

Curva(P'' + L): curva padrão de ORZ com 40% A e 60% B;

Curva(P''' + L): curva padrão de ORZ com 20% A e 80% B;

As variações observadas na **Figura VII. 2.** e **Figura VII. 3.** não são significativas. Tal como evidenciou a análise estatística ANOVA para análise da variância num intervalo de confiança de 95% (ver **Figura VII. 4.**).

Uma vez que, os padrões de todas as curvas foram preparados a partir da mesma solução stock, variando as razões acetonitrilo:água o padrão máximo também irá variar. Com vista a melhorar a visualização dos resultados evidenciaram-se apenas os padrões de ORZ no intervalo de 1 a 10 µg/mL. No entanto, a estatística ANOVA foi realizada incluindo todos os padrões de cada curva.

Estatisticamente a curva padrão (P) e a (P') são semelhantes, sendo assim, a ausência de TFA não provoca variações significativas.

Pela análise estatística, também se verificou que não existem diferenças significativas quando comparadas as curvas (P') e (P' + L), (P') e (P''), (P'') e (P'' + L). Os resultados obtidos levam a admitir que as absorvâncias das respectivas concentrações de ORZ, em diferentes percentagens de acetonitrilo, são semelhantes e que a presença de lipossomas vazios não interfere nos resultados.

Dado o acetonitrilo ser tóxico e volátil, optou-se pela curva padrão com menor percentagem de acetonitrilo (20%) para a quantificação da ORZ incorporada nos lipossomas.

De seguida, realizaram-se três preparações da curva padrão seleccionada, observando-se uma reprodutibilidade nos resultados obtidos. Efectuaram-se novas preparações como salvaguarda do método, demonstrando ser preciso, rigoroso e existir linearidade na gama de concentrações de ORZ dos padrões, o que serviu de garantia para a sua utilização como o método preferencial em detrimento do método de quantificação de ORZ por HPLC (cromatografia líquida de alta pressão). Esta escolha deve-se principalmente ao facto da técnica ser mais rápida, mais simples e menos dispendiosa.

						Anova: Single Factor							
						ANOVA							
						<i>Source of Variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>	
						Between Groups	0,01211	1	0,01211	0,060041	0,8126	11,25863	
						Within Groups	1,61363	8	0,201704				
						Total	1,62574	9					
						ANOVA							
						<i>Source of Variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>	
						Between Groups	0,062885	1	0,062885	0,332051	0,580299	11,25863	
						Within Groups	1,515064	8	0,189383				
						Total	1,577949	9					
						ANOVA							
						<i>Source of Variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>	
						Between Groups	0,002278	1	0,002278	0,037983	0,851909	13,74519	
						Within Groups	0,359863	6	0,059977				
						Total	0,362141	7					
						ANOVA							
						<i>Source of Variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>	
						Between Groups	0,00484	1	0,00484	0,124358	0,733466	11,25863	
						Within Groups	0,31136	8	0,03892				
						Total	0,3162	9					


**Figura VII. 4** – Resultados da análise estatística ANOVA para análise da variância das principais curvas padrão.

## ANEXO II

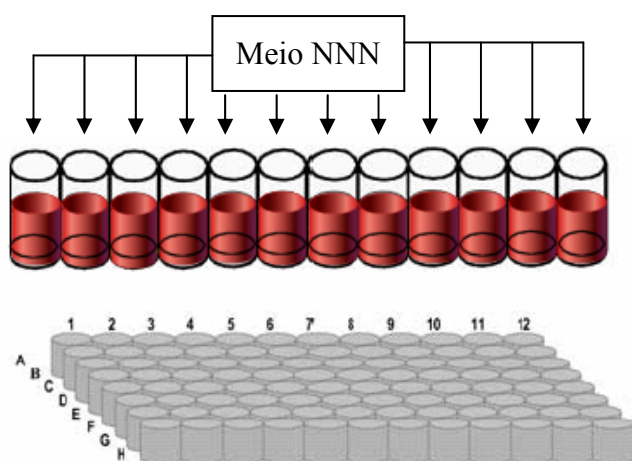
Para a realização dos estudos parasitológicos pelo método de diluição limite foi necessário a preparação prévia das microplacas com um meio sólido NNN (NOVY, MACNEAL and NICOLLE). Assim, neste anexo será descrito o protocolo de preparação.

### Composição:

Bacto-agar (Difco) ..... 14g  
NaCl ..... 6 g  
Água desmineralizada ..... 900 ml  
Sangue de Coelho desfibrinado ..... 10 a 20 %

### Protocolo:

1. Dissolver o NaCl em água desmineralizada.
2. Aquecer a solução.
3. Adicionar agar, lentamente na solução aquecida de modo a evitar a formação de flocos.
4. Deixar a solução a ferver durante alguns minutos, com continua agitação.
5. Esterilizar a solução preparada no autoclave.
6. Após a esterilização, manter a solução, num banho à temperature de 45 °C para a adição de 3 mL de sangue de coelho desfibrinado [10 a 20 % (v/v)], com agitação (meio NNN preparado).
7. Adicionar 50 µL do meio NNN em todos os poços da microplaca, mantendo o sistema a 45 °C (**Figura VII. 5.**).
8. Depois do meio NNN solidificar nas microplacas, conservar a 4 °C para posterior uso.



**Nota:** o sangue de coelho desfibrinado foi adquirido à Probiologica, Portugal.

**Figura VII. 5** – Microplaca com meio NNN.



## **ANEXO III**

A título ilustrativo, no decorrer das operações realizadas no estudo parasitológico foram feitas anotações dos resultados na **Tabela VII. 1.**

**Tabela VII. 1.** – Tabela onde se efectuaram as anotações durante a realização da experiência *in vivo*.

Grupo	Animal nº	Data Murganhos eutanaziados	Método da diluições limite (Buffet <i>et al.</i> )				Método das impressões (Stauber <i>et al.</i> )			
			Peso do fragmento de baço (g)	Parasitas/ /menor diluição	Nº de promastigotas / g órgão	Média ± DP	Peso baço (g)	Parasitas por 500 núcleos baço	Nº de amastigotas / g órgão	Média ± DP
1	1	28-02-2005								
	2									
	3									
2	1	7-03-2005								
	2									
	3									
3	1	21-03-2005								
	2									
	3									
4	1	4-04-2005								
	2									
	3									
5	1	18-04-2005								
	2									
	3									
6	1	2-05-2005								
	2									
	3									





## **VII. - ANEXOS**

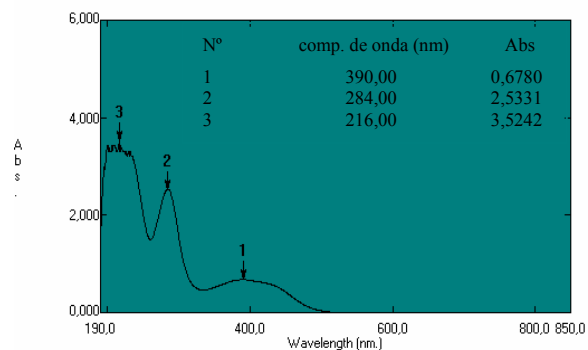


## ANEXO I

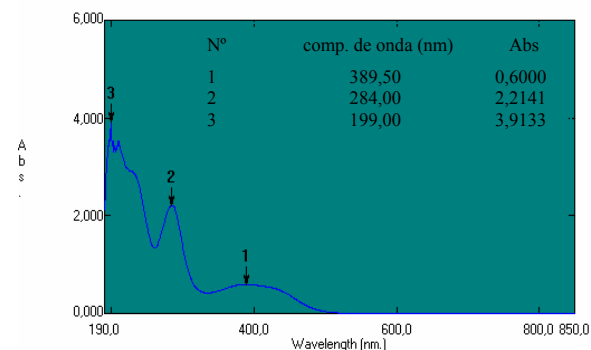
A otimização do método de doseamento de ORZ foi dividida em duas fases.

Numa primeira fase, prepararam-se várias soluções para a realização de espectros de absorvância (alguns deles já foram evidenciados na parte experimental em 2.2.1):

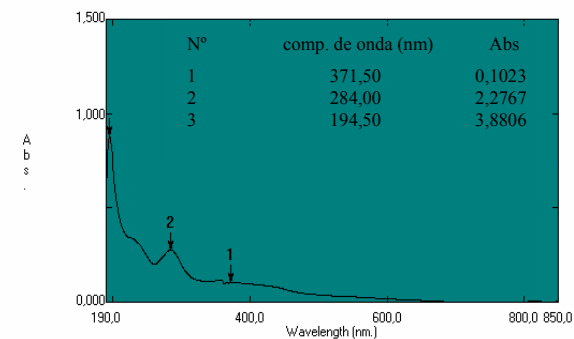
1. Solução stock de ORZ 50  $\mu\text{g/mL}$  dissolvida em acetonitrilo 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) (**Figura VII. 1.A.**);
2. Solução stock de ORZ 50  $\mu\text{g/mL}$  dissolvida em acetonitrilo (**Figura VII. 1.B.**);
3. Diluição (1/10) das duas soluções stock, obtendo-se duas soluções de ORZ com uma concentração de 5  $\mu\text{g/mL}$  (concentração teórica doseada após diluição de 1/60 de uma concentração de 1  $\mu\text{mol/mL}$ , usada na preparação dos lipossomas de PC:PG com uma razão molar 4:1);
4. Lipossomas vazios (lipossomas com uma concentração de lípido total de 10  $\mu\text{mol/mL}$  diluídos 1/60);
5. Solução com razão 60% acetonitrilo + 40% água desmineralizada ( $\text{H}_2\text{O}_d$ ) (**Figura VII. 1.D.**);
6. Solução com razão 60% acetonitrilo 0,1% TFA + 40%  $\text{H}_2\text{O}_d$  0,1% TFA (**Figura VII. 1.E.**);
7. Solução com razão 40% acetonitrilo + 60%  $\text{H}_2\text{O}_d$  (**Figura VII. 1.F.**);
8. Solução com razão 20% acetonitrilo + 80%  $\text{H}_2\text{O}_d$ .



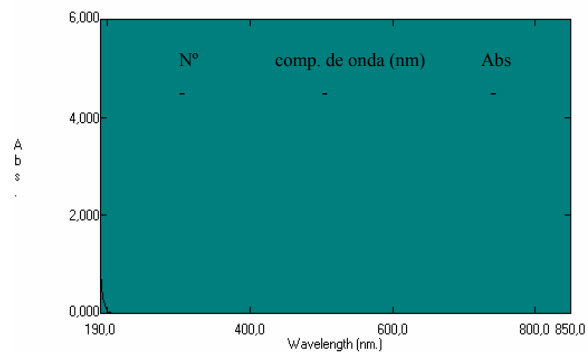
**A.** - Espectro da solução preparada em 1.



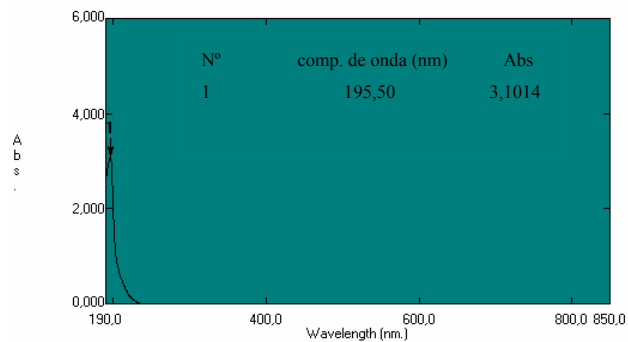
**B.** - Espectro da solução preparada em 2.



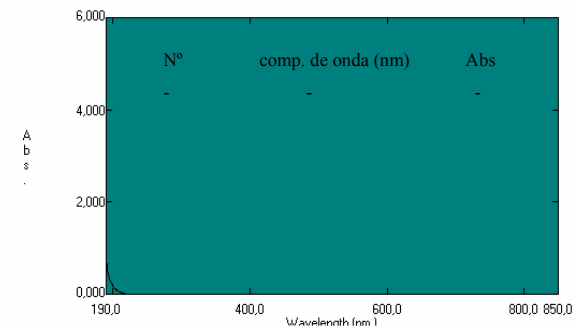
**C.** - Espectro da solução de ORZ com uma concentração de 5 µg/mL (dissolvida em acetonitrilo com 0,1% de TFA).



**D.** - Espectro da solução preparada em 5.



**E.** - Espectro da solução preparada em 6.

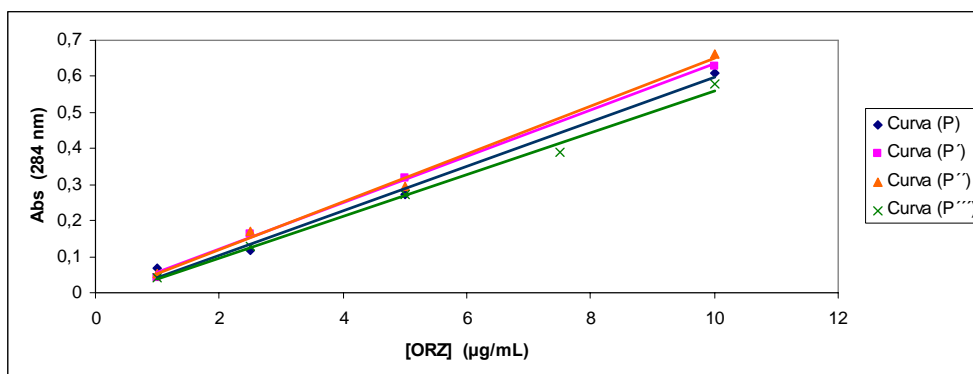


**F.** - Espectro da solução preparada em 7.

**Figura VII. 1.** - Espectros de absorção de diferentes soluções, obtidos por varrimento de comprimento de onda entre 190 e 850nm, em diferentes condições experimentais.



Numa segunda fase, efectuaram-se diferentes curvas padrão com diferentes concentrações de acetonitrilo, estudando o efeito da presença de ácido trifluoroacético (TFA) e lipossomas vazios na leitura das absorvâncias. As curvas padrão foram preparadas pelo método descrito na parte experimental em 2.2.1. De seguida serão apresentados os gráficos das curvas, com e sem lipossomas vazios, e o tratamento estatístico dos resultados obtidos.



**Figura VII. 2** - Curvas padrão de ORZ com diferentes concentrações de acetonitrilo na presença ou ausência de TFA..

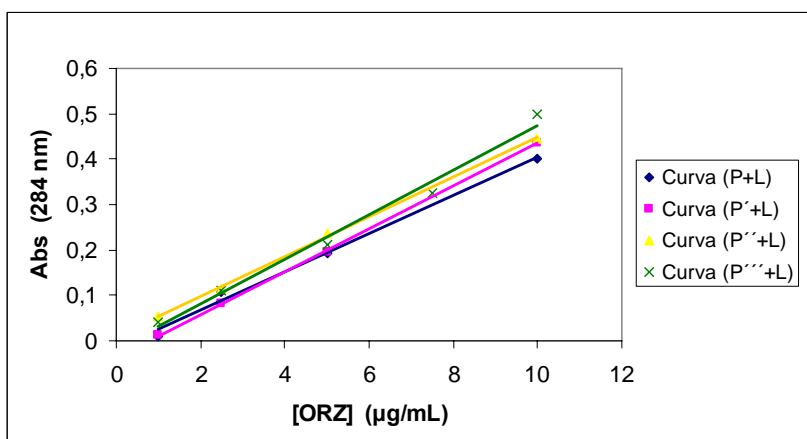
Curva (P): curva padrão de ORZ com 60% A e 40% B com 0,1% de TFA;

Curva(P'): curva padrão de ORZ com 60% A e 40% B;

Curva(P''): curva padrão de ORZ com 40% A e 60% B;

Curva(P'''): curva padrão de ORZ com 20% A e 80% B;

A – acetonitrilo; B – água desmineralizada; L – lipossomas vazios



**Figura VII. 3** - Curvas padrão de ORZ com diferentes concentrações de acetonitrilo na presença de lipossomas vazios.

Curva (P + L): curva padrão de ORZ com 60% A e 40% B com 0,1% de TFA;

Curva(P' + L): curva padrão de ORZ com 60% A e 40% B;

Curva(P'' + L): curva padrão de ORZ com 40% A e 60% B;

Curva(P''' + L): curva padrão de ORZ com 20% A e 80% B;

As variações observadas na **Figura VII. 2.** e **Figura VII. 3.** não são significativas. Tal como evidenciou a análise estatística ANOVA para análise da variância num intervalo de confiança de 95% (ver **Figura VII. 4.**).

Uma vez que, os padrões de todas as curvas foram preparados a partir da mesma solução stock, variando as razões acetonitrilo:água o padrão máximo também irá variar. Com vista a melhorar a visualização dos resultados evidenciaram-se apenas os padrões de ORZ no intervalo de 1 a 10 µg/mL. No entanto, a estatística ANOVA foi realizada incluindo todos os padrões de cada curva.

Estatisticamente a curva padrão (P) e a (P') são semelhantes, sendo assim, a ausência de TFA não provoca variações significativas.

Pela análise estatística, também se verificou que não existem diferenças significativas quando comparadas as curvas (P') e (P' + L), (P') e (P''), (P'') e (P'' + L). Os resultados obtidos levam a admitir que as absorvâncias das respectivas concentrações de ORZ, em diferentes percentagens de acetonitrilo, são semelhantes e que a presença de lipossomas vazios não interfere nos resultados.

Dado o acetonitrilo ser tóxico e volátil, optou-se pela curva padrão com menor percentagem de acetonitrilo (20%) para a quantificação da ORZ incorporada nos lipossomas.

De seguida, realizaram-se três preparações da curva padrão seleccionada, observando-se uma reprodutibilidade nos resultados obtidos. Efectuaram-se novas preparações como salvaguarda do método, demonstrando ser preciso, rigoroso e existir linearidade na gama de concentrações de ORZ dos padrões, o que serviu de garantia para a sua utilização como o método preferencial em detrimento do método de quantificação de ORZ por HPLC (cromatografia líquida de alta pressão). Esta escolha deve-se principalmente ao facto da técnica ser mais rápida, mais simples e menos dispendiosa.

					Anova: Single Factor							
					ANOVA							
<b>[ORZ] (µg/mL)</b>	<b>10</b>	<b>5</b>	<b>2,5</b>	<b>1</b>	<i>Source of Variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>	
Abs P	0,609	0,273	0,118	0,068	Between Groups	0,01211	1	0,01211	0,060041	0,8126	11,25863	
Abs P'	0,63	0,319	0,163	0,043	Within Groups	1,61363	8	0,201704				
					Total	1,62574	9					
					ANOVA							
<b>[ORZ] (µg/mL)</b>	<b>10</b>	<b>5</b>	<b>2,5</b>	<b>1</b>	<i>Source of Variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>	
Abs P'	0,63	0,319	0,163	0,043	Between Groups	0,062885	1	0,062885	0,332051	0,580299	11,25863	
Abs P'+L	0,437	0,197	0,081	0,013	Within Groups	1,515064	8	0,189383				
					Total	1,577949	9					
					ANOVA							
<b>[ORZ] (µg/mL)</b>	<b>10</b>	<b>5</b>	<b>2,5</b>	<b>1</b>	<i>Source of Variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>	
Abs P''	0,63	0,319	0,163	0,043	Between Groups	0,002278	1	0,002278	0,037983	0,851909	13,74519	
Abs P'''	0,578	0,272	0,129	0,041	Within Groups	0,359863	6	0,059977				
					Total	0,362141	7					
					ANOVA							
<b>[ORZ] (µg/mL)</b>	<b>10</b>	<b>7,5</b>	<b>5</b>	<b>2,5</b>	<b>1</b>	<i>Source of Variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
Abs P'''	0,578	0,389	0,272	0,129	0,041	Between Groups	0,00484	1	0,00484	0,124358	0,733466	11,25863
Abs P''' + L	0,498	0,326	0,212	0,112	0,041	Within Groups	0,31136	8	0,03892			
					Total	0,3162	9					

**Figura VII. 4** – Resultados da análise estatística ANOVA para análise da variância das principais curvas padrão.

## ANEXO II

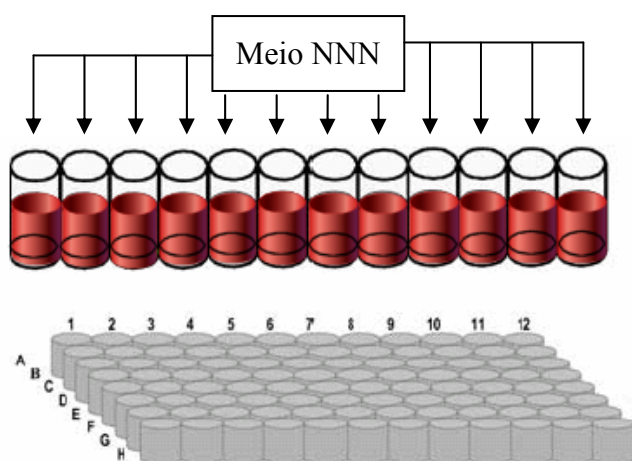
Para a realização dos estudos parasitológicos pelo método de diluição limite foi necessário a preparação prévia das microplacas com um meio sólido NNN (NOVY, MACNEAL and NICOLLE). Assim, neste anexo será descrito o protocolo de preparação.

### Composição:

Bacto-agar (Difco) ..... 14g  
NaCl ..... 6 g  
Água desmineralizada ..... 900 ml  
Sangue de Coelho desfibrinado ..... 10 a 20 %

### Protocolo:

1. Dissolver o NaCl em água desmineralizada.
2. Aquecer a solução.
3. Adicionar agar, lentamente na solução aquecida de modo a evitar a formação de flocos.
4. Deixar a solução a ferver durante alguns minutos, com continua agitação.
5. Esterilizar a solução preparada no autoclave.
6. Após a esterilização, manter a solução, num banho à temperature de 45 °C para a adição de 3 mL de sangue de coelho desfibrinado [10 a 20 % (v/v)], com agitação (meio NNN preparado).
7. Adicionar 50 µL do meio NNN em todos os poços da microplaca, mantendo o sistema a 45 °C (**Figura VII. 5.**).
8. Depois do meio NNN solidificar nas microplacas, conservar a 4 °C para posterior uso.



**Nota:** o sangue de coelho desfibrinado foi adquirido à Probiologica, Portugal.

**Figura VII. 5** – Microplaca com meio NNN.

## **ANEXO III**

A título ilustrativo, no decorrer das operações realizadas no estudo parasitológico foram feitas anotações dos resultados na tabela VII.1.

**Tabela VII. 1.** – Tabela onde se efectuaram as anotações durante a realização da experiência *in vivo*.

Grupo	Animal nº	Data Murganhos eutanaziados	Método da diluições limite (Buffet <i>et al.</i> )				Método das impressões (Stauber <i>et al.</i> )			
			Peso do fragmento de baço (g)	Parasitas/ /menor diluição	Nº de promastigotas / g órgão	Média ± DP	Peso baço (g)	Parasitas por 500 núcleos baço	Nº de amastigotas / g órgão	Média ± DP
1	1	28-02-2005								
	2									
	3									
2	1	7-03-2005								
	2									
	3									
3	1	21-03-2005								
	2									
	3									
4	1	4-04-2005								
	2									
	3									
5	1	18-04-2005								
	2									
	3									
6	1	2-05-2005								
	2									
	3									



